



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**



**ESTUDO DA ATIVIDADE DO ALCALOIDE MILONINA, EM MODELOS EXPERIMENTAIS
DE INFLAMAÇÃO AGUDA E DOR**

LARISSA RODRIGUES SILVA

João Pessoa – PB

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**



LARISSA RODRIGUES SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO ALCALOIDE MILONINA, EM MODELOS EXPERIMENTAIS
DE INFLAMAÇÃO AGUDA E DOR**

**Projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências
Exatas e da Natureza da Universidade Federal da
Paraíba, para obtenção do grau de MESTRE em
BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR, Área de
concentração: BIOLOGIA E FISILOGIA CELULAR.**

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam

João Pessoa

2017

S586e

Silva, Larissa Rodrigues.

Estudo da atividade do Alcaloide Milonina, em modelos experimentais de inflamação aguda e dor / Larissa Rodrigues Silva. - João Pessoa, 2017.

88 f. : il. -

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Inflamação aguda. 2. *Cissampelos sympodialis*.
3. Alcaloide. 4. Milonina. 5. Anti-inflamatório. 6. Nocicepção.
I. Título.

UFPB/BC

CDU: 616-002.1(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR



LARISSA RODRIGUES SILVA

Dissertação de mestrado avaliada em 28/04/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam (Orientadora)
Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira (Membro interno)
Departamento de Biologia Molecular – UFPB

Profa. Dra. Louisa Andrade (Membro externo)
Departamento de Biologia Molecular – UFPB

*Dedico aos meus pais, **Rubens** e **Rosemary**, pela educação que me possibilitou concluir mais uma fase da minha vida acadêmica.*

*Meu irmão **Erick** por ser meu incentivo.*

*Ao meu marido **Bertúlio**, sempre companheiro e paciente me apoiando em todos os obstáculos.*

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota".

- Madre Tereza de Calcutá

Agradecimentos

Primeiramente a **Deus**, pois sem Ele eu nada seria e minha vida não faria sentido.

Aos **meus pais**, Rubens Silva e Rosemary Barros, pelo amor incondicional, por serem meu exemplo de vida e porto seguro. Ao **meu querido irmão** Erick Silva, que sempre esteve do meu lado, principalmente em momentos que me senti perdida. Às **minhas irmãs** Raíssa e Lorena, que são crianças maravilhosas e mesmo distantes nunca deixaram de me amar. Ao **meu marido** Bertúlio, que todos os dias me mostra o verdadeiro significado do amor, que consegue fazer do meu pior dia algo bom, que sempre confia no meu potencial e me traz paz. Aos **meus familiares**, avó, tias, tios, primos e primas por estarem presentes mesmo que de longe para saber como estou e qual o meu próximo passo na vida.

A **minha orientadora**, Prof. Dra. Márcia Regina Piuvezam pelo exemplo de dedicação à pesquisa, orientação, espírito científico, paciência, disponibilidade e pela oportunidade a mim oferecida. Existe poucos profissionais como você! MUITO OBRIGADA!

Aos **meus amigos**, de infância Marcela e Mário e durante a graduação Polyanna, Daiana, Gustavo, Jéssica e Wilson que mesmo sendo poucos são suficientes para que possa confiar de olhos fechados.

Aos **colegas do Mestrado**, Diana, Sarah, Vanessa, Giulian Aleson e Laísa pelas saídas e conversas sobre a vida, bem como pela discussão científica, vocês são excelentes profissionais. Angélica, Rafaela e Francielly pelos conselhos, por acreditarem no meu potencial, nas minhas ideias, nos meus devaneios, principalmente quando nem eu mais acreditava.

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo ensinamento e troca que contribuíram para minha formação científica.

Aos **funcionários do laboratório**, Crispim e Luis, que sempre atenderam meu pedido de ajuda com os animais e a Mônica por sua alegria de todos os dias e conseguir transmitir isso.

Aos **colegas de laboratório**, todos os alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos que tornaram o ambiente laboratorial mais divertido, seja pela troca de ideias e aprendizagem que transformaram muitos momentos de angústia e incerteza em força. À Raquel, Allysson, Laércia, Larissa, Luiz, Carol, Bianka, Talissa que me ajudaram em experimentos, em especial ao Adriano, que mesmo morando longe, se fez presente para me

auxiliar e ajudar na execução deste trabalho. Ao professor Reinaldo e a Renan pela colaboração e ajuda com o teste antinociceptivo para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal da Paraíba**, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades; à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) e à **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** (PRPG), pelo apoio financeiro.

RESUMO

O processo inflamatório é uma resposta benéfica do organismo frente a uma lesão ou infecção, visando a eliminação da injúria inicial, bem como as consequências dessa injúria. Entretanto, a inflamação, em resposta exagerada, pode ser prejudicial. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades anti-inflamatória e analgésica, sendo utilizado como estratégia terapêutica a busca por moléculas oriundas de produtos naturais que possuam tais propriedades. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório da milonina, alcaloide de *Cissampelos sympodialis* Eichl frente à liberação de mediadores inflamatórios utilizando o modelo murino de inflamação aguda e dor. Camundongos Swiss pré-tratados com milonina foram submetidos aos protocolos de: edema de pata induzido por LPS, prostaglandina (PGE_2), bradicinina (BK) e serotonina (5-HT) para avaliar a atividade antiedematogênica do alcaloide; permeabilidade microvascular induzida por ácido acético para obter a concentração de proteínas totais e análise histológica do peritônio; os modelos de peritonite induzida por carragenina para avaliar o efeito da milonina sobre a migração de células totais e diferenciais; e o teste da formalina para avaliar a sua atividade nociceptiva. Os resultados demonstraram que a milonina foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) a formação do edema de pata induzido por LPS, PGE_2 , BK, porém não foi capaz de reduzir o edema induzido pela 5-HT; diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o extravasamento de líquido para o peritônio induzido por ácido acético, mantendo a sua morfologia preservada. O alcaloide também foi capaz de inibir ($p < 0,01$) a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal durante a inflamação induzida por carragenina, diminuindo o número de células polimorfonucleares (PMN) sem alterar células mononucleares (MNs). No teste da formalina, o tempo de lambida da pata dos animais foi inibida ($p < 0,01$) por milonina apenas na segunda fase quando administrada por via intraperitoneal (i.p.). Portanto, este estudo demonstrou que a milonina possui atividade anti-inflamatória e analgésica por inibir a ação de mediadores essenciais para o início do processo inflamatório.

Palavras-chave: *Cissampelos sympodialis*, inflamação aguda, alcaloide, milonina, anti-inflamatório, nocicepção.

ABSTRACT

Inflammation is an immune response that aims to establish a tissue homeostasis during an infection or injury. Recognized as a beneficial process, an inflammation can become harmful when in excess. Thus, therapeutic therapies that are applied to the resolution of the inflammation are studied and developed, with natural products and their derivatives playing a prominent role in the discoveries of new anti-inflammatory molecules. In this context, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential of milonine, a *Cissampelos sympodialis* Eichl alkaloid, *in vivo*, against the release of mediators by using the murine model of acute inflammation and pain. Swiss mice pretreated with milonine were submitted to protocols of: paw edema induced by LPS, prostaglandin (PGE₂), bradykinin (BK) and serotonin (5-HT) to evaluate the anti-edematogenic activity of the alkaloid; microvascular permeability induced by acetic acid to obtain a total protein concentration and histological analysis of the peritoneum; the models of carrageenan-induced peritonitis to evaluate the effect of milonine on the migration of the total and differential cells; and the formalin test to evaluate its nociceptive activity. The results show that milonine was capable of significantly reduce ($p<0.001$) the formation of the paw edema induced by LPS, PGE₂, BK, however it was not capable to reduce the edema induced by 5-HT; significantly reduced ($p<0.05$) the extravazation of liquid to the peritoneum induced by acetic acid, maintaining its morphology preserved. The alkaloid was also able to inhibit ($p<0.01$) the migration of the total leukocytes to the peritoneal cavity during the carrageenan-induced inflammation, decreasing the number of polymorphonuclear cells (PMN) without changing mononuclear cells (MNs). In the formalin test, the paw licking time of the animals was inhibited ($p<0.01$) only in the second phase through the intraperitoneal (i.p.) administration, corroborating the inhibition of inflammatory mediators. Therefore, this study demonstrates that milonine has an anti-inflammatory and analgesic activity due to the inhibition of the action of mediators essential for the start of the inflammatory process.

Keywords: *Cissampelos sympodialis*, acute inflammation, alkaloid, milonine, anti-inflammatory, nociception.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido Araquidônico
Ach	Acetilcolina
ADP	Difosfato de Adenosina
AFL	Fração alcóolica das folhas
AFR	Fração alcóolica das raízes
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ANOVA	Análise de variância
B1R e B2R	Receptor de bradicinina 1 e 2
BK	Bradicinina
BLT 1,2	Receptor de leucotrieno 1 e 2
COX	Ciclooxigenase
cPLA₂	Fosfolipase A ₂
CysLTs	Leucotrienos cisteinil
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EMP	Erro padrão da média
EP	Receptor de prostaglandina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HCL	Ácido clorídrico
HR	Receptor de histamina
IASP	Associação internacional do estudo da dor
IL-1,6, 8	Interleucinas 1,6,8
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
LT	Leucotrieno
LTB4	Leucotrieno B4
Lis-BK	Calidina
LPS	Lipopolissacarídeo
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos

NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Tampão salina fosfato
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial e plaquetária
PKC	Proteína Quinase C
PGE₂	Prostaglandina E ₂
RANTES	Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
VCAM	Molécula de adesão vascular celular
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo esquemático migração e adesão leucocitária na parede endotelial

Figura 2. Representação esquemática do processo de dor inflamatória

Figura 3. Estrutura bidimensional da milonina

Figura 4. Análise histológica da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito antiedematogênico da milonina induzido por LPS

Gráfico 2: Efeito antiedematogênico da milonina induzido por prostaglandina

Gráfico 3: Efeito antiedematogênico da milonina induzido por bradicinina

Gráfico 4: Efeito antiedematogênico da Milonina induzido por serotonina

Gráfico 5: Efeito da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético

Gráfico 6: Efeito da milonina na peritonite induzida por carragenina

Gráfico 7: Efeito da milonina no teste da formalina na pata dos animais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. INFLAMAÇÃO.....	18
1.1.1.1 INFLAMAÇÃO AGUDA.....	18
1.1.1.2 Eventos vasculares.....	19
1.1.1.3 Eventos celulares.....	19
1.1.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA.....	22
1.1.3 AUTOINFLAMAÇÃO.....	22
1.1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	23
1.1.4.1 Aminas Vasoativas.....	23
1.1.4.2 Eicosanóides.....	24
1.1.4.3 Sistema das Cininas.....	26
1.1.4.4 Citocinas.....	27
1.1.4.5 Óxido Nítrico.....	28
1.1.5 DOR INFLAMATÓRIA.....	29
1.2 PLANTAS MEDICINAIS.....	30
1.3 <i>CISSAMPELOS SYMPODIALIS</i> (MENISPERMEACEAE).....	31
1.3.1 Considerações sobre alcalóides isolados de <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.....	32
1.3.2 Alcaloide milonina.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos.....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1 O Isolamento e preparo da milonina.....	38
3.2 Animais.....	38
3.3 Tratamento com o alcaloide.....	38
3.4 Edema de pata induzido por agentes flogísticos: LPS, prostaglandinas, bradiginina e serotonina.....	39
3.5 Avaliação da permeabilidade microvascular (ácido acético).....	39
3.6 Coleta de tecido e análise histológica.....	40
3.7 Teste de peritonite induzida por carragenina	40
3.8 Teste da formalina.....	40
3.9 Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Atividade anti-inflamatória da milonina.....	43

4.1.2. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por lipopolissacarídeo (LPS).....	43
4.1.3. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	45
4.1.4. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por bradicinina (BK).....	46
4.1.5. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por serotonina (5-HT).....	47
4.1.6 Efeito anti-inflamatório da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético.....	48
4.1.7. Análise histológica do pré-tratamento com a milonina no teste de permeabilidade microvascular induzida pelo ácido acético.....	50
4.1.8. Efeito anti-inflamatório da milonina na celularidade total e diferencial do lavado peritoneal induzida por carragenina.....	52
4.2. Atividade antinociceptiva.....	54
4.2.1. Efeito analgésico da milonina induzida intraplantar pela formalina.....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXO.....	87

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é uma resposta fundamentalmente protetora do corpo desencadeada por estímulos nocivos a fim de eliminar patógenos, reparar tecidos danificados e restaurar a homeostase (MEDZHITOV, 2008). A inflamação é causada por diversos fatores, como agentes físicos (trauma, contusões), agentes químicos (corrosivos), agentes biológicos (bactérias, parasitas, vírus e fungos), lesão tecidual causada por corpos estranhos ou ainda reações imunológicas como as autoimunes. De forma abrangente, o processo inflamatório apresenta manifestações clínicas que se caracterizam por rubor, inchaço, calor, dor e perda da função do tecido.

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos: aguda ou crônica. Esta divisão está baseada geralmente na duração e características patológicas da reação inflamatória.

1.1.1 Inflamação aguda

O processo da inflamação aguda se caracteriza por ser uma resposta imediata no intervalo de minutos a dias. Este evento, comumente benéfico para o indivíduo, é desencadeado devido à ocorrência de lesões celulares e teciduais. Os componentes principais da inflamação aguda envolvem alterações vasculares, onde ocorre alteração do fluxo e calibre dos vasos; e a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos para o local da lesão, pois a função é erradicar o estímulo inicial e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação (MEDZHITOV, 2008; RAJESH *et al.*, 2014).

Quando o processo inflamatório agudo é bem sucedido, reparando o tecido lesionado, ou apresentando a formação de cicatriz, a homeostasia é restaurada. Dessa forma, a inflamação aguda tem como objetivo principal a eliminação do agente agressor, seguido por uma fase de resolução e reparação, que é mediado principalmente por macrófagos (MEDZHITOV, 2010; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

1.1.1.1 Eventos vasculares

Em homeostase, as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão comumente presentes no interior dos vasos, se deslocando no sentido do fluxo sanguíneo. Em um processo inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem alterações que induzem a passagem de proteínas plasmáticas e células da circulação para o local da lesão ou da infecção (RYAN & MAJNO, 1977).

Os efeitos vasculares se iniciam com alterações no fluxo e calibre dos vasos sanguíneos estimulados pelas moléculas pró-inflamatórias como a histamina, leucotrienos e prostaglandinas e do óxido nítrico (NO) produzido por células endoteliais que acarretam os sinais cardinais da inflamação, e desenvolvem-se em velocidades variáveis de acordo com a intensidade da lesão. Em seguida, após uma vasoconstrição das arteríolas em consequência da contração do músculo liso presente na parede desses mesmos vasos, que dura alguns segundos, ocorre vasodilatação, que promove o aumento do fluxo sanguíneo, que gera calor através da hiperemia arterial, e rubor pelo acúmulo de glóbulos vermelhos (NUNES & ABREU, 2012).

À medida que vai ocorrendo o aumento do fluxo sanguíneo, a vasodilatação das artérias irá provocar um aumento da pressão hidrostática entre os vasos, resultando, dessa forma, em um extravasamento de líquidos dos capilares para os tecidos. Este processo é exacerbado pelo aumento da permeabilidade vascular que é induzido, por exemplo, pela histamina e cininas, além de outros mediadores que irão provocar aberturas entre as células endoteliais e vão permitir a passagem de leucócitos e de líquido rico em proteínas plasmáticas (exsudato) no sítio da lesão tecidual resultando no edema (RYAN & MAJNO, 1977; KUMAR, ABBAS & ASTER, 2012; RAJESH *et al.*, 2014).

1.1.1.2 Eventos celulares

As alterações celulares nas primeiras horas da lesão se caracterizam por um infiltrado de origem neutrofílica que no decorrer do processo e do estímulo da lesão vão sendo substituídos por células mononucleares. Para alcançar o foco da infecção, o recrutamento dos leucócitos envolve uma série de etapas ocorrendo na margem da parede endotelial para o espaço extravascular, que são acompanhados pelo processo de vasodilatação. Essas etapas são a marginação e rolagem, a aderência e a diapedese.

Muitas citocinas induzem expressão de moléculas de adesão (selectinas e integrinas); estas estão presentes na membrana de leucócitos e células endoteliais. Além disso, a presença de quimiocinas permitem o aumento da interação das integrinas com os seus ligantes, promovendo uma adesão mais estável entre o leucócito e endotélio, assim permite o direcionamento dos leucócitos ao local lesado. Ao final dessas etapas, os leucócitos presentes na região da infecção uma vez ativados irão iniciar o processo da fagocitose (RYAN & MAJNO, 1977; POBER & SESSA, 2007).

No processo de marginação, os leucócitos se aderem de maneira fraca na parede do endotélio, que em seguida resulta na rolagem sobre a parede do vaso, mediada pelas moléculas de adesão como, por exemplo, as selectinas. Essas moléculas de adesão de células vasculares estão envolvidas nas interações de adesão de leucócitos e plaquetas da circulação sanguínea. Há três membros da família das selectinas: P, E e L-selectinas. A P-selectina se expressa em células endoteliais e plaquetas, sendo a selectina a responsável na célula endotelial pela fase mais precoce do recrutamento celular no processo inflamatório. A L-selectina está expressa em todos os leucócitos, exceto nos linfócitos de memória ativados. Esta selectina contribui para a migração de linfócitos e neutrófilos até os sítios inflamatórios. A E-selectina é responsável pela adesão de neutrófilos, monócitos e células T a sítios inflamatórios (**Figura 1**) (HILL, 2011; JUBELI *et al.*, 2012; MITSUI *et al.*, 2015).

Após o rolamento, segue-se a aderência firme mediada por moléculas codificadas pelos genes da superfamília das imunoglobulinas e integrinas. A superfamília das imunoglobulinas constitui uma diversidade de proteínas de cadeia única com vários domínios de características semelhantes às das imunoglobulinas e agem como ligantes de outras moléculas de adesão. Quatro membros atuam como ligantes para leucócitos nas células endoteliais: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM-1 (MAKRILIA *et al.*, 2009; WAI WONG C, DYE DE & COOMBE, 2012). As integrinas são uma família de moléculas de adesão que são constituídas de uma subunidade α - e outra – β . As subunidades possuem segmentos extracelulares, transmembrana e citoplasmático. Os segmentos extracelulares se ligam às proteínas da matriz extracelular e a outras proteínas de superfície celular, inclusive moléculas de adesão da classe da superfamília das imunoglobulinas (HENDERSON & SHEPPARD, 2013; WRIGHT, MEURS & DEKKERS, 2014). A expressão da afeição dessas moléculas de adesão é modulada pelos mediadores inflamatórios liberados pelas células residentes.

As células migram através dos vasos sanguíneos, e atravessam o tecido intersticial por fendas existentes entre as células do endotélio. Este processo é denominado de

diapedese ou transmigração, em que são atraídos por sinais químicos, tais como a interleucina-8 (IL-8), C5a, Interferon-gama (IFN- γ) e leucotrieno B4, num processo denominado de quimiotaxia. (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; KLEBANOFF & CLARK, 1978).

Havendo o controle do processo inflamatório, a inflamação diminui gradativamente devido ao fato dos mediadores possuírem uma meia-vida curta, sendo rapidamente degradados e apenas produzidos se o estímulo persistir. Dessa forma, a fase resolutive se desenvolve e o processo desencadeia vários sinais que contribuem para o término da resposta inflamatória e restabelecem a homeostase.

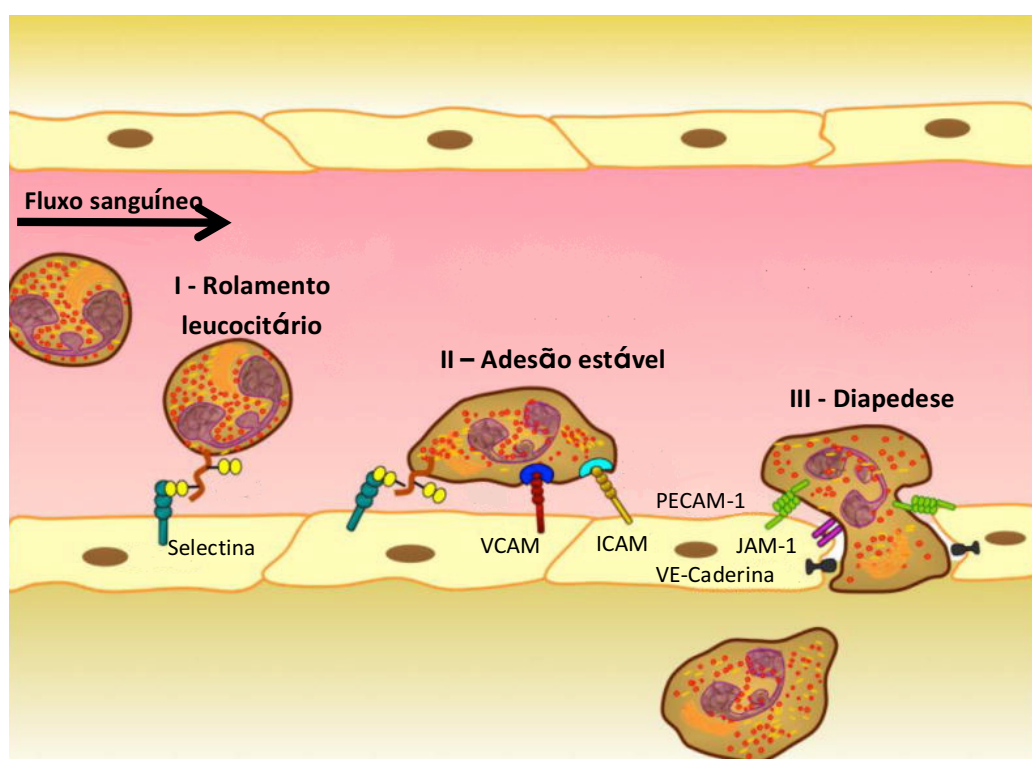


Figura 1. Processo esquemático migração e adesão leucocitária na parede endotelial. Em resposta a estímulos inflamatórios, as moléculas de adesão tais como as selectinas e glicoproteínas presentes em células endoteliais e leucócitos interagem, o que possibilita uma ligação temporária. Esta interação permite que os leucócitos rolem ao longo da parede endotelial vascular (I). Isto é seguido por adesão firme de leucócitos ao endotélio através da ligação de integrinas na superfície de leucócitos a ICAM-1 ou VCAM-1 na superfície de células endoteliais (II). Em seguida, as células migram através do endotélio microvascular pelo processo de diapedese que envolve interações complexas com moléculas de junção de célula-célula endotelial, incluindo VE-caderina, JAMs e PECAM-1 (III) (ADAPTADO de YUAN *et al.*, 2012).

1.1.2 Inflamação crônica

Quando o estímulo do processo inflamatório agudo não é suprimido, a inflamação permanece e avança para outro nível, no qual ocorrem alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, ou seja, os neutrófilos dão lugar a uma combinação de células como os linfócitos e os macrófagos (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014). Dessa forma, esse avanço se caracteriza pela inflamação crônica que apresenta maior duração (semana, meses e talvez anos) e está relacionada à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005).

Para finalizar e eliminar todos os tipos de sinais da inflamação é preciso inativar a produção de mediadores inflamatórios, bem como a remoção do aglomerado de células inflamatórias, sem que desencadeie uma resposta autoimune. As células da série fagocítica do tipo mononuclear são responsáveis pela eliminação das células inflamatórias que sofreram apoptose na fase resolutive da inflamação, acarretando a restauração do tecido inflamado e o retorno à homeostasia (BUCKLEY *et al.*, 2013).

Assim, quando a inflamação é exarcebada ou exagerada, o processo inflamatório deixa de ser uma resposta benéfica e passa a contribuir para a patogênese de várias doenças, como doenças auto-imunes, câncer e diabetes, etc.

1.1.3 Autoinflamação

Em recentes pesquisas, incluem uma nova categoria de inflamação, a auto inflamação. Este termo foi proposto pela primeira vez em 1999 para descrever um grupo de doenças inflamatórias sistêmicas que se diferencia das doenças autoimunes tradicionalmente definidas (McDERMOTT *et al.*, 1999).

A autoinflamação se caracteriza por episódios de inflamação aparentemente desencadeada por componentes exógenos e endógenos, sendo resultado de disfunção da imunidade inata, responsável pela primeira linha de defesa imunológica, de resposta imediata a agentes agressores externos e internos. Diferentemente de doenças autoimunes que são desencadeadas por linfócitos T autoreativos e autoanticorpos altamente específicos para os agentes patogênicos que atuam na resposta imune adaptativa (KANAZAWA, TCHERNEV & WOLLINA, 2014; KEMPEN *et al.*, 2015).

Quando um processo provoca uma desregulação do sistema imunitário inato, isso desencadeará um estado pró-inflamatório patogênico, o qual a via de sinalização comum resulta na ativação do inflamassoma com o resultante excesso de citocinas. Dessa forma,

este é o principal mecanismo que o sistema imunitário inato está relacionado na patofisiologia das doenças autoinflamatórias (KEMPEN *et al.*, 2015; CUSH, 2013). Como exemplo, temos a Febre Familiar do Mediterrâneo (FFM), que apresenta um estado pró-inflamatório pela produção de IL-1b, o que explica parcialmente o mecanismo de alguns achados dessa enfermidade (CHAE *et al.*, 2008).

1.1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

1.1.4.1 Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas que compreendem mediadores denominados de histamina e serotonina apresentam função nas fases iniciais do processo inflamatório. A permeabilidade vascular e o aumento do fluxo sanguíneo ocorrem em decorrência da dilatação das vênulas por ação dessas aminas (BARNES *et al.*, 1998). Aparentemente esses mediadores são liberados ao mesmo tempo em quantidade suficiente para realizar seu efeito máximo na permeabilidade vascular (DI ROSA *et al.*, 1971).

Uma enzima triptofano sintetase age sobre o triptofano e sintetiza uma amina que é conhecida como serotonina ou também chamada de 5-hidroxitriptamina. Este processo ocorre principalmente em células do tipo enteroendócrina, as chamadas de enterocromafins, que ocorrem no epitélio que reveste o lúmen do trato digestivo e respiratório. Porém, elas podem ocorrer também em mastócitos, nos neurônios e células musculares. (BISCHOFF *et al.*, 2009).

Nos tecidos periféricos, a serotonina é secretada por mastócitos e plaquetas simultaneamente com a histamina por degranulação induzida por mediadores, como substância P. Esta amina desencadeia o processo de hiperalgesia por ação direta em receptores de serotonina em neurônios aferentes sensoriais primários. A serotonina se assemelha nas suas ações com a histamina, ou seja, desencadeia vasoconstrição inicial, e, juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (KOPP, 1998).

A ação da histamina é mediada por quatro tipos de receptores de membrana para a histamina (HRs): HR1, HR2, HR3 e HR4, os quais são receptores acoplados à proteína G. Diante disso, esses receptores possuem características semelhantes à da proteína, incluindo sete domínios transmembranares, sítios de glicosilação amino-terminais, sítios de fosforilação de proteína quinase, e proteína quinase C (PKC) (JUTEL, 2002). O receptor H4,

além da presença conjunta com os outros receptores, está presente na medula óssea e em células hematopoiéticas periféricas. Ele é responsável pela estimulação da quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos, bem como o controle da função de células T. Através desses quatro subtipos de receptores, a histamina desempenha um papel importante no sistema complexo de imunoregulação e na inflamação alérgica aguda e crônica (SIMONS, 2011).

Além disso, esta amina é responsável pelas respostas alérgeno-inflamatório devido ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas-1 α (IL-1), IL-1 β , IL-6 e as quimiocinas, RANTES ou IL-8, em vários tipos de células e tecidos locais. Na inflamação alérgica, esse mediador é responsável pela regulação do acúmulo de granulócitos (eosinófilos) e a sua migração.

O efeito da histamina sobre a migração de eosinófilos pode ser diferente de acordo com a concentração. Em altas concentrações a quimiotaxia de eosinófilos é inibida pelo receptor de histamina H2, em contrapartida, no caso de baixas concentrações, a quimiotaxia de eosinófilos é aumentada através do receptor de histamina H1 (AKDIS, 2006).

1.1.4.2 Eicosanóides

Um dos primeiros eventos na resposta inflamatória é a liberação do ácido araquidônico (AA), que está armazenado no interior de fosfolípidios de membrana de forma esterificada. Depois que as células são ativadas, várias fosfolipases como a A2 (PLA₂) catalisam a hidrolização do segundo ácido graxo dos fosfolípidios. Com o aumento do cálcio intracelular através dos canais de cálcio, a cPLA₂ (um dos tipos de fosfolipases cálcio dependente) libera a saída de ácido araquidônico. O AA é então convertido em um produto intermediário denominado PGH₂ prostaglandinas (PG) pelas cicloxigenases (COX) e em leucotrienos pela 5-lipoxigenase (YOKOMIZO, 2014; HARRIS, 2002).

O produto intermediário da prostaglandina, o PGH₂, possui pouca função no organismo, mas serve como substrato para a biossíntese de diversas PGs com atividades biológicas distintas. Dessa forma, a PGH₂ é convertida pelas prostaglandinas sintases das células específicas em diversos derivados como PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , prostaciclina (PGI₂) e em tromboxanos (TX) (HARRIS, 2002; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

A maioria dos receptores das prostaglandinas está localizada na superfície da membrana celular acoplado à proteína G, porém também existem receptores na membrana nuclear. Nesse caso, os ligantes atuam na transcrição e alteração de expressão gênica

(GONZÁLEZ, 2003). Os papéis fisiológicos e patológicos desses receptores dependem de complexos conjuntos de interações entre receptor e ligante, que, por sua vez, depende de diversos fatores como: afinidade, perfil de expressão e contexto celular no qual o receptor é expresso (HATA, 2004).

As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, como: homeostase, trombose, angiogênese, câncer e ulcerações. Elas são responsáveis pelo aumento da inflamação em tecidos e o desenvolvimento dos sinais cardinais. As sensações de dor, por exemplo, ocorrem pela ativação de receptores de PGE_2 nos neurônios sensoriais (SYKES, 2014; AOKI, 2012).

A PGD_2 é um dos principais produtos da COX, formada em mastócitos ativos. Ela possui diversas funções biológicas como vasodilatação e bronco-constricção. Estudos mostram que este eicosanoide também pode estar envolvido na fase tardia em respostas de reações alérgicas (FUJITANI, 2002).

A PGE_2 é sintetizada por diversas células do organismo humano, como, fibroblastos, células endoteliais e musculares lisas. Ela é responsável pelo aumento da permeabilidade microvascular e vasodilatação, acarretando em dois sinais cardiais da inflamação: rubor (vermelhidão) e edema (GOMEZ, 2013).

Os leucotrienos podem se dividir em dois grupos: os diidroxi-leucotrienos e os leucotrienos peptídicos. O primeiro grupo é formado, principalmente, pelo leucotrieno B4 (LTB4), produzido pela hidrólise do LTA4 através da enzima LTA4 hidrolase. Esse LT é um quimioatrator dos fagócitos, devido a sua alta expressão de 5-lipoxigenase em contraste com a baixa expressão de cicloxigenases. O LTB4 está relacionado a diversas funções, entre elas: estimulação e ativação de neutrófilos, e aumento da produção de interleucina-6, na qual acarreta a transcrição precoce de genes em células mononucleares. (YOKOMIZO, 2011).

O leucotrieno B4 possui diversos receptores, dentre eles os principais citados na literatura são os receptores BLT1 e BLT2. O receptor BLT1 foi isolado em diferentes espécies e em todas se apresentou como um receptor de alta afinidade para BTL4. Análises com *Northern Blot* revelaram que esse receptor está altamente presente em leucócitos (KATO, 2000). Camundongos deficientes em BTL1 mostram fenótipos (características da enfermidade) reduzidos em vários modelos inflamatórios, tais como peritonite e asma brônquica. O BTL2 é expresso em células epiteliais e queratinócitos e está associada a liberação de enzimas lisossomais e o aumento do metabolismo oxidativo. Além disso, ambos os receptores apresentam atuação quimiotática, pois possuem uma ação inibitória da

proteína G, inibindo a adenilato ciclase e ativando a fosfolipases C, aumentando o cálcio intracelular e, consequentemente, a quimiotaxia (YOKOMIZO, 2011).

O segundo grupo é formado pelos leucotrienos cisteinil (CysLTs). Eles estão presentes em diversos grupos de células como mastócitos e macrófagos, principalmente nas áreas alveolares. As CysLTs podem gerar vasodilatação, relevante no recrutamento de leucócitos e no início de uma resposta inflamatória (BUSSE, 1998). Eles também estão relacionados na fisiopatologia da asma, identificados em níveis elevados em broncoscopia e expectoração induzida (WILSON, 2004). Diversos estudos com inibidores de leucotrienos têm sido realizados com o objetivo de reduzir as crises de asma em pacientes e as reações alérgicas. As pesquisas clínicas iniciaram nos anos 80 e essas substâncias agem de duas maneiras: redução da ação da proteína ativadora da 5-lipoxigenase, bloqueio da própria 5-lipoxigenase e antagonização da ação dos leucotrienos-cisteinil em seus receptores (BORGES, 2001).

1.1.4.3. Sistema das Cininas

Durante a coagulação sanguínea são ativadas algumas moléculas responsáveis em desencadear a resposta inflamatória. Uma dessas moléculas é chamada de fator de Hageman (fator XII), que é uma proteína produzida pelo fígado que atua na cascata de coagulação e se apresenta em uma forma inativa ou ativa no colágeno ou nas plaquetas (RENNE *et al.*, 2012).

A ação do fator de Hageman na inflamação se dá a partir da ativação de quatro sistemas. Um deles é o sistema cinina, responsável por produzir mediadores importantes para resposta inflamatória, isto é, peptídeos a partir de proteínas plasmáticas denominadas cininogênios (KENNE & RENNE, 2014). A produção de cininas durante a resposta inflamatória se dá a partir das seguintes vias: no plasma, no tecido e uma via plasma independente de tecido. A via no plasma ocorre inicialmente com a ativação e interação do fator XII com a pré-caliceína e também com um cininogênio de alto peso molecular. Uma vez que o fator XII é ativado, a pré-caliceína se converte em caliceína, favorecendo assim a conversão do fator XII a fator XIIa. Desse modo, à medida que ocorre a ativação da caliceína, haverá uma sequência de eventos e há liberação da bradicinina (SHARMA & AL-SHERIF, 2011).

A bradicinina (BK) é um peptídeo fisiológico e farmacologicamente do grupo de proteínas de cininas, que consiste em nove aminoácidos. Este peptídeo faz com que os vasos sanguíneos se dilatem e, por conseguinte, faz com que a pressão no sangue diminua.

Vale ressaltar que sua ação é semelhante a da histamina, podendo causar também a hiperalgesia, vasodilatação, contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular (BUJAK-GIŻYCKA, 2011; MAURER *et al.*, 2011).

As cininas produzidas dentro de microambientes teciduais inflamatórios, onde exercem suas funções, dependem da sinalização de dois receptores: o receptor de cinina 2 (B2R) que é expresso constitutivamente e o receptor de cinina 1 (B1R) (SHARMA, 2014).

Receptores B2R são distribuídos ao longo dos tecidos periféricos e centrais e têm uma maior afinidade para (BK) e peptídeos Lis-BK. Em contrapartida, os receptores B1R são expressos em baixos níveis sob condições normais e de exibição de alta afinidade para alguns metabólitos. No entanto, os receptores B1 sofrem um rápido aumento da regulação sobre estímulos inflamatórios, estimulação de citocinas ou de lesão da célula. (CHAO, BLEDSOE & CHAO, 2014; KASHUBA *et al.*, 2013).

1.1.4.4 Citocinas

As citocinas representam um grupo de proteínas que desempenham um papel importante em eventos da inflamação, elas são sintetizadas por vários tipos celulares em resposta a um estímulo, além de regular a imunidade inata e adaptativa. Outras citocinas são responsáveis por estimular os precursores na medula óssea para a formação de mais leucócitos, fazendo com que esses sejam substituídos durante o processo inflamatório e também nas respostas imune (SHACHAR & KARIN, 2013).

As citocinas são representadas por interleucinas (IL) que induzem a interação entre os leucócitos (GRUNNET & MANDRUP, 2012); fator de necrose tumoral (TNF), que apresentam atuação pró e anti-inflamatória; interferons (IFN) que agem contra alguns tipos de infecções (COOPER, MAYER-BARBER & SHER, 2011); e quimiocinas atuam na quimiotaxia.

O processo inflamatório apresenta dois grupos principais de citocinas: pró-inflamatórias (IL-1, TNF α e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13). As citocinas pró-inflamatórias são aquelas sintetizadas por macrófagos e estão envolvidas na regulação das reações inflamatórias. Já as citocinas anti-inflamatórias são aquelas derivadas de células T e apresentam a função de regulação negativa das reações inflamatórias (BANCHEREAU, PASCUAL & O'GARRA, 2012; TURNER *et al.*, 2014).

Dentre as citocinas, existe um grupo de moléculas com funções quimiotáticas para diferentes subconjuntos de leucócitos que são denominadas quimiocinas, algumas delas

são IL-8, MIP, MCP-1. Estas são responsáveis por regular o processo dinâmico celular, bem como promover a migração destes leucócitos até o local da inflamação tecidual por meio do sangue. As quimiocinas são produzidas por vários tipos celulares como macrófagos, monócitos, células estruturais e endoteliais (COMMINS, BORISH & STEINKE, 2010).

Dessa forma, as citocinas são mediadores importantes para orientar a resposta inflamatória aos locais de estímulo, promovendo a resolução da inflamação. Entretanto, com a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias diante de um estímulo, o organismo pode sofrer lesões no órgão-alvo, que contribui com a insuficiência de múltiplos órgãos e até a morte. E diante da presença de citocinas anti-inflamatórias nesses locais, podem diminuir alguns desses efeitos (FATKHULLINA, PESHKOVA & KOLTSOVA, 2016; WOJDASIEWICZ *et al.*, 2014).

1.1.4.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre na forma de gás que se forma nas células endoteliais, alguns neurônios e macrófagos, induzindo a dilatação do vaso sanguíneo a partir do relaxamento da musculatura lisa. Trata-se de um dos principais mediadores do processo inflamatório (TOUSOULIS *et al.*, 2012).

A síntese do NO se dá a partir de uma enzima denominada óxido nítrico sintase (NOS), fazendo uso do aminoácido L-arginina. Esta enzima se apresenta em três tipos: endotelial (eNOS), neural (nNOS) e induzível (iNOS) (FLEMING, 2010; PETHÖ & REEH, 2012). A eNOS é sintetizada principalmente no endotélio. A nNOS se expressa nos neurônios e não apresenta papel importante na inflamação. O iNOS é a enzima responsável pela produção de NO na inflamação (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012; WINK *et al.*, 2011; GALVÃO & CARVALHO, 2014). Essas enzimas podem ser ativadas em duas formas: à medida que as enzimas óxido nítrico sintase, neural e endotelial se apresentam em baixas concentrações, haverá um influxo maior de cálcio no meio, consequentemente resultando no aumento da produção do NO. Por outro lado, a enzima óxido nítrico sintase induzível será ativada pelos macrófagos, estimulando assim a formação de citocinas e mediadores como, por exemplo, o TNF α , IL-1 e IFN γ (KOBAYASHI, 2010).

Os efeitos do NO podem ser tanto pró-inflamatórios, causando a vasodilatação, como anti-inflamatório, apresentando a função de regular a resposta inflamatória. Além disso, este gás pode causar a inibição de alguns eventos da inflamação como a degranulação dos mastócitos, impedindo também a migração dos leucócitos (LI, HSU & MOORE, 2009; FARO *et al.*, 2014).

1.1.5 Dor inflamatória

Com a liberação de inúmeros mediadores atuando no processo inflamatório, alguns deles também estimulam os neurônios sensoriais locais, o que acaba contribuindo para o desenvolvimento da dor (HADDAD, 2007).

A dor pode ser definida segundo a Associação Internacional do Estudo da Dor (*Internacional Association for the Study of Pain - IASP*) como uma experiência que envolve aspectos emocionais e sensoriais desagradáveis que pode ou não estar associada a um dano tecidual.

Quando falamos sobre dor inflamatória, nos referimos que ocorre devido à sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários, em virtude de um tecido inflamado que se torna sensível a estímulos (CUNHA *et al.*, 2005). A dor inflamatória não ocorre imediatamente após ou durante um estímulo, mas sim após a ativação da cascata de citocinas, seguida da liberação de outros mediadores por células não-neuronais, como mastócitos, macrófagos e neutrófilos. Entre os mediadores envolvidos estão as prostaglandinas (PGE) e leucotrienos, bradicinina (BK), histamina, serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), citocinas, glutamato, óxido nítrico (NO), adenosinatrifosfato (ATP), adenosinadifosfato (ADP), substância P, polipeptídeos vasoativos e muitos outros (HADDAD, 2007; KIDD & URBAN, 2011).

A dor inflamatória tem um papel importante, pois permite sinalizar a ocorrência do dano tissular, limitando a movimentação pela hiperalgesia (sensibilidade aumentada) e dor espontânea até que o reparo esteja completo, minimizando mais danos. Normalmente, a dor inflamatória diminui à medida que o dano e a resposta inflamatória se resolvem (**Figura 2**) (WOOLF, 2004).

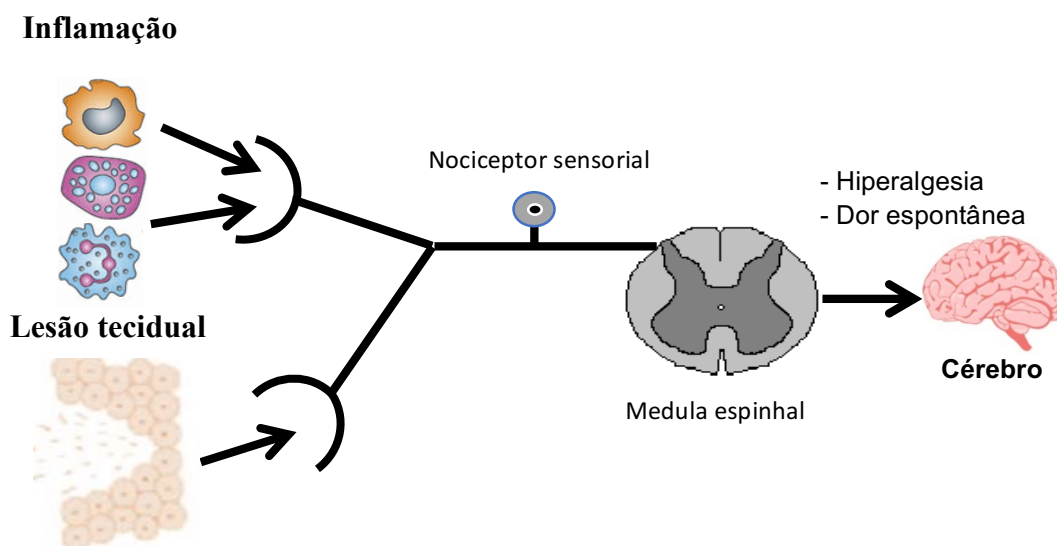


Figura 2. Representação esquemática do processo de dor inflamatória. Em resposta a uma lesão tecidual acompanhada de inflamação, ocorre liberação de mediadores que ativam e sensibilizam estruturas periféricas (nociceptor sensorial) e transmitem o sinal para sistema nervoso central que é traduzido como dor (Adaptado de WOOLF, 2004).

1.2 Plantas Medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) mostra que apesar do avanço ao longo dos últimos 30 anos em relação às políticas públicas, ainda há um número alto de indivíduos que não tem como obter medicamentos essenciais ou até mesmo o acesso restrito a serviços de saúde convencionais, principalmente para países em desenvolvimento (ARNOUS *et al.*, 2005). Na tentativa de suprir esses limitados recursos, populações utilizam as plantas medicinais como alternativa para tratar suas enfermidades (MOURA *et al.*, 2001).

A OMS reconhece que qualquer planta que apresente em sua composição substâncias para uso terapêutico é considerada planta medicinal ou até mesmo utilizada como início para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos, o que conhecemos como fitoterápicos. O Brasil é um país com uma vasta diversidade biológica e também cultural, o que conta com o grande acúmulo de conhecimentos tradicionais, dos quais se destacam os ensinamentos e manuseios passados por gerações no uso de plantas medicinais (VEIGA *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2006).

A fim de unir esse conhecimento cultural com a realidade atual, estudos científicos de várias regiões do mundo têm sido realizados, no sentido de investigar a atividade farmacológica dos produtos naturais de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças (FOGLIO *et al.*, 2006; DORIGONI *et al.*, 2001).

Diversas pesquisas com plantas medicinais permitiram a descoberta de centenas de compostos úteis como, a morfina, proveniente do ópio. Estes compostos são de muitos tipos, mas a maioria está em quatro grandes classes bioquímicas, os alcaloides, glicosídeos, polifenóis e terpenos (ATANASOV *et al.*, 2015).

Para que se possam estudar as possíveis atuações biológicas dessas plantas, bem como suas substâncias, é imprescindível que haja uma integração multidisciplinar, nas quais envolvem outras áreas de conhecimento como a botânica, química, farmacologia e toxicologia com o objetivo de validar a eficácia e segurança das espécies de plantas, no intuito de relacionar os constituintes ativos às atividades farmacológicas (RATES, 2001; BRASIL, 2011; GULLO e HUGHES, 2005).

1.3. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae)

O gênero *Cissampelos* compreende cerca de 19 espécies, sendo nove delas ocorrem no Brasil (Rhodes, 1979). No estado da Paraíba são encontradas três espécies em diferentes tipos de *habitat* ocorrendo, sobretudo em regiões de floresta da costa atlântica (MANGUEIRA *et al.*, 2010). Uma dessas espécies é a *Cissampelos sympodialis* Eichl conhecida popularmente como “milona”, “orelha de onça”, “jarrinha” ou ainda “abuteira” (CORREA, 1984).

Suas folhas e raízes são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias como: doenças respiratórias, doenças no trato genitourinário, diarreia, doenças cardíacas, entre outras enfermidades (MANGUEIRA *et al.*, 2010). Com o intuito de avaliar o potencial terapêutico e também respaldar cientificamente o uso da planta na medicina popular, foram feitos vários estudos utilizando diferentes modelos experimentais com o extrato hidroalcoólico das raízes e folhas, bem como seu alcaloide majoritário, a warifteína.

Os extratos hidroalcoólico das raízes (AFR – *alcoholic fraction from roots*) e folhas (AFL – *alcoholic fraction from leaves*) de *C. sympodialis* demonstraram efeito relaxante na musculatura lisa, e aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) em macrófagos do lavado broncoalveolar, possivelmente ligado à inibição das enzimas fosfodiesterases, na musculatura traqueal de cobaias (THOMAS *et al.*, 1995; THOMAS, BURNS & PYNE, 1997b). Além disso, estudos com a AFL apresentaram um efeito antidepressivo em cérebros de ratos (ALMEIDA *et al.*, 1998), indução da contração do músculo liso vascular (FREITAS *et al.*, 2000), e a inibição da degranulação de neutrófilos humanos (THOMAS, SELAK & HENSON, 1999).

1.3.1 Considerações sobre alcalóides isolados de *Cissampelos sympodialis* Eichl

Os alcaloides são origem vegetal e apresentam compostos pertencentes ao grupo das aminas cíclicas, que possuem anéis heterocíclicos contendo nitrogênio. Nas plantas, os alcaloides têm função de defesa contra insetos e animais predadores.

Na espécie *C. sympodialis* foram isolados e identificados os seguintes alcaloides: a metilwarifteína e warifteína, sendo alcaloides do tipo bisbenzilisoquinolínico, a milonina, um alcaloide do tipo morfinânico, a liriodenina, alcaloide do tipo oxoaporfínico e a roraimina, um alcaloide do tipo bisbenziltretaisoquinolínico que têm permitido estudos imunofarmacológicos mais precisos sobre os mesmos (BARBOSA-FILHO, AGRA e THOMAS, 1997; DE LIRA *et al.*, 2002). A warifteína é o composto majoritário isolado do extrato etanólico da raiz do *Cissampelos sympodialis* Eichl, (MELO *et al.* 2003), com rendimento de 1,4% (MARINHO, 2008) e a milonina o composto majoritário do extrato etanólico das folhas (THOMAS *et al.*, 1997a).

Estudos com a warifteína demonstraram sua capacidade de inibir a produção de cistenil-leucotrienos e o influxo de eosinófilos, promovido pelo processo alérgico da asma. (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006). Além disso, verificou-se a redução da resposta de linfócitos T e a produção de IgE, em modelo de alergia induzido por ovalbumina (COSTA *et al.*, 2008). Rocha e colaboradores (2010), observaram a diminuição da proliferação de células B e a produção de imunoglobulinas, que são ações mediadas pelo aumento dos níveis de AMPc intracelulares.

Outro composto isolado, a metil-warifteína, um derivado metilado da warifteína desencadeou o aumento dos níveis de AMPc, em homogenato de músculo liso, apresentando efeito superior à warifteína (THOMAS, BURNS, PYNE, 1997b), promoveu a diminuição do número de linfócitos T no lavado bronco alveolar, propondo que os compostos de *C. sympodialis* regulem essa população de células (VIEIRA *et al.*, 2012). Tanto a warifteína como a metil-warifteína apresentam efeitos imunomoduladores na alergia alimentar com aumento de células Treg e a diminuição de citocinas provenientes de células do mecanismo imune inato, independente do mecanismo adaptativo (COSTA *et al.*, 2013).

1.3.2 Alcaloide milonina

A milonina (**Figura 3**), um alcaloide 8,14 dihidromorfinandeinônico, isolado e identificado por Freitas e colaboradores (1995), apresentou atividade espasmolítica da

musculatura lisa do endotélio da artéria mesentérica de ratos através de efeitos hipotensivos, ação vasorrelaxante mediado pelo endotélio via liberação de óxido nítrico e abertura de canais de potássio (CAVALCANTE *et al.*, 2011), porém independente das prostaglandinas e dos adrenoreceptores β_2 (CAVALCANTE, 2003).

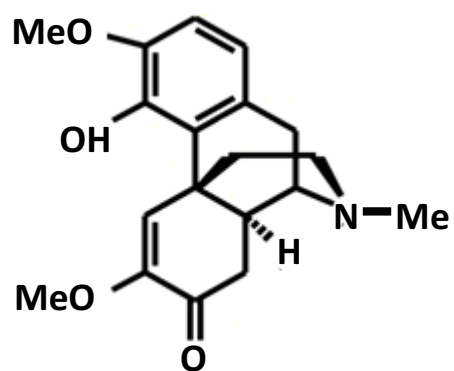
Em estudos citotóxicos a fim de comparar os alcaloides warifteína e milonina *in vitro*, descobriu-se que, em cultura de hepatócitos de ratos e células fibroblastos tratados com cimetidina, um inibidor do citocromo P450, que a milonina se apresentou menos tóxica que a warifteína nos dois tipos celulares. Além disso, observou-se que a cimetidina não conseguiu proteger as células contra a toxicidade dos alcaloides, mostrando que a toxicidade independe do citocromo P450 (MELO, *et al.*, 2003).

Em estudos recentes desenvolvidos no laboratório de Imunofarmacologia da UFPB/João Pessoa. PB, Brasil, demonstrou-se que a milonina apresentou atividade anti-inflamatória via inibição da degranulação de mastócitos, e que no modelo experimental de choque anafilático induzido por 48/80, aumentou a sobrevivência dos animais. A atividade antinociceptiva foi sugerida atuar pela via periférica em teste de contorções induzidas com ácido acético (ALVES, 2016).

Atualmente, vários medicamentos encontram-se disponíveis para uso clínico como analgésicos e/ou anti-inflamatórios, corticosteróides, os opióides e os AINEs. Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades terapêuticas seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tal fato encoraja a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação anti-inflamatória e/ou analgésica.

Diante disso, o presente estudo se justifica pelo fato de alcaloides isolados de *C. sympodialis* estarem envolvidos em eventos vasculares e celulares dos processos inflamatórios, bem como os extratos das folhas e raízes dessa planta exibirem efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos e imunomoduladores. Portanto, a milonina pode ser mais um dos alcaloides da planta a exercer seus efeitos anti-inflamatório e analgésico acrescentando, portanto, mais uma molécula no arsenal de moléculas com tais atividades e respaldar cientificamente os efeitos dos extratos da folha da planta, onde esse alcaloide se encontra em altas concentrações.

Neste contexto, temos como objetivo investigar os efeitos da milonina de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) em modelos experimentais de inflamação aguda e dor, no que diz respeito a sua possível propriedade anti-inflamatória e analgésica frente à liberação de mediadores.



MILONINA

Figura 3. Estrutura bidimensional da milonina.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e analgésica da milonina de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) em modelos experimentais de inflamação aguda e dor.

2.2. Específicos

1. Avaliar o edema de pata induzido pelo LPS para triagem do mecanismo de ação.
2. Estudar o mecanismo de ação antiedematogênico da milonina utilizando PGE₂, BK e 5-HT.
3. Estudar efeito da milonina no modelo experimental de permeabilidade microvascular via a quantificação de proteínas presentes no exsudato.
4. Avaliar por cortes histológicos o peritônio de camundongos tratados com milonina no modelo de permeabilidade microvascular induzidos com ácido acético.
5. Estudar a atividade da milonina na migração celular em modelo de peritonite.
6. Avaliar a atividade de analgesia da milonina no teste da formalina induzida nas patas dos animais.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Isolamento e preparo da milonina

O alcaloide foi fornecido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho. A partir do AFL (extrato hidroalcoólico das folhas de *C. sympodialis*), a milonina foi isolada com o uso de cromatografia de coluna sob a adsorvente alumina seguida de uma cromatografia em camada delgada para separação de misturas (FREITAS, 1995). O composto foi preparado da seguinte forma: 1 mg da milonina em 50 μ L de HCl 1N e adicionado 800 μ L de solução salina (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado para 7 com uma solução de hidróxido de sódio 1M e acrescido de solução salina para 1000 μ L.

3.2. Animais

Camundongos Swiss fêmeas (*Mus Musculus*), com seis semanas de idade (25-30g), fornecidos pelo biotério Professor Thomas George da Universidade Federal da Paraíba/João Pessoa, PB, Brasil, foram utilizados durante a execução do trabalho. Grupos de animais (n=6–7) foram utilizados para cada protocolo experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C e submetidos a ciclos de claro/escuro de 12h, com total acesso a água e uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* (PURINA), durante o período de experimentação. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFPB) sob nº 003/2016.

3.3. Tratamento com o alcaloide

Os camundongos submetidos ao modelo de edema de pata foram tratados com milonina nas doses 1,0 ou 2,0mg/kg ou PBS, administradas por via oral (v.o.). Sob esta via todos os animais foram tratados 1 hora antes dos desafios com os agentes flogísticos. Aos demais modelos de inflamação foram apenas tratados com milonina na dose 1,0mg/kg (v.o) pois foi a dose do alcaloide com melhor efeito nos protocolos de *screening*. Para o teste de nocicepção, a milonina foi administrada por uma via oral e outra intraperitoneal (i.p) na dose 1,0mg/kg, 1h antes do desafio com o agente flogístico, a via i.p foi incluída para comparação

com a droga padrão, a morfina, um alcaloide da mesma classe. A escolha das doses de milonina utilizadas nesse estudo foi baseada nos estudos anteriores (VIEIRA, 2013; ALVES, 2016).

3.4. Edema de pata induzido por agentes flogísticos: LPS, prostaglandina, bradicinina e serotonina.

Os camundongos Swiss (n=7/grupo), receberam, de acordo com o protocolo descrito acima, a milonina (MIL 1,0mg/kg ou MIL 2,0mg/kg) ou droga padrão indometacina (INDO 10mg/kg). Em seguida, por via intraplantar, na pata esquerda, receberam 20 µl de PBS contendo LPS (25 µg/pata), PGE₂ (5 µg/pata), BK (6 nmol/pata) ou 5-HT (5-hidroxitriptamina, 1%, p/v). A pata direita recebeu o mesmo volume de PBS, que foi utilizada como controle (CAMPOS & CALIXTO, 1995). Alterações no volume da pata foram medidas por um paquímetro digital em vários intervalos de tempo de acordo com cada agente flogístico (24, 48, 72, 96 h; 30 e 60 min; 15 e 30 min; 15 e 30 min respectivamente). A diferença entre o tamanho das patas direita e esquerda foi quantificada e tomada como índice de edema (NAIDU *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2012; SANTIAGO *et al.*, 2015).

3.5. Avaliação da permeabilidade microvascular (ácido acético)

A administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,6% desencadeia reação inflamatória local e envolve liberação de mediadores, que provocam a permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos rico em proteínas (exsudato) para o interstício. A concentração de proteínas totais presentes no exsudato é quantificada por *Kits* específicos de dosagem de proteínas totais (PINHEIRO, *et al.* 2013). A metodologia utilizada foi a do biureto, que permite a determinação quantitativa de proteínas totais e tem como base o desenvolvimento de uma cor violeta em solução aquosa resultante da reação da proteína com o reagente mencionado. Para esse experimento foram utilizados grupos de camundongos (n=7/grupo) tratados previamente com milonina (MIL 1,0mg/kg ou 2,0mg/kg), indometacina (INDO 10 mg/kg, v.o.), ou veículo (grupo controle). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 300 µL de ácido acético (Reagen) (0,6%) (i.p), com exceção do grupo basal que receberam 300 µL de PBS utilizando a mesma via de administração, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação. Vinte minutos após o desafio com ácido acético, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram seus peritônios lavados com 3 ml de água destilada. Após esse procedimento, 50 µL de cada amostra foram transferidas para placas de 96 poços, juntamente com 150 µL de

reagente de biureto (Labtest) conforme a orientação do fabricante do Kit. A placa foi incubada por 10 min em estufa de 37 °C e a medida do extravasamento vascular foi estimada indiretamente pela intensidade da cor azul, obtida com a determinação das absorbâncias a 540 nm, utilizando leitor de microplacas (KROHN, 2011; LOH, LEONG e SETHI, 2013).

3.6. Coleta de tecido e análise histológica

Os peritônios dos animais tratados com milonina e desafiados com ácido acético foram coletados e fixados imediatamente em solução de formol 10% durante 24 horas e posteriormente submetidos ao processamento histológico convencional que consiste na desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Após isso, foram geradas secções de 5 µm por microtomia, esses cortes foram fixados em lâminas para microscopia e coradas para a quantificação de parâmetros inflamatórios, para isso, utilizou-se do corante Hematoxilina & Eosina. As lâminas foram avaliadas via microscópio óptico comum. As imagens foram obtidas em aumento total de 10X com o auxílio da microcâmara moticam5 (5MP).

3.7. Teste de peritonite induzida por carragenina

A peritonite se baseia na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, esse processo ocorre na presença de um estímulo que neste caso foi a carragenina. Os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados por via oral com a milonina (MIL1,0mg/kg) ou indometacina (INDO10 mg/kg), e 1 hora após os tratamentos foi administrado por via intraperitoneal uma solução de carragenina a 1%. Após 4h do estímulo com o agente flogístico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS (BOZZA *et al.*, 1994). O peritônio foi cuidadosamente massageado por 30 segundos. A partir do infiltrado celular, foram realizadas: a contagem total de leucócitos (câmara de Neubauer) e a contagem diferencial de leucócitos (hematoxilina e eosina) para caracterizar a população celular (CUNHA *et al.*, 1989).

3.8. Teste de formalina

Os animais (n=7/grupo) foram tratados com milonina (1mg/kg; v.o.), ou com igual volume de PBS (v.o), milonina (1mg/kg; i.p) ou fármaco padrão morfina (5 mg/kg; i.p.). Sessenta minutos após cada tratamento, os camundongos (n=7) receberam uma injeção

intraplantar de formalina a 1% (20 μ L/ animal). Após a administração da formalina, os animais foram colocados individualmente dentro de um recipiente triangular de vidro e foi cronometrado o tempo (em segundos) que passaram lambendo a pata traseira esquerda em duas fases (0-5 min primeira fase; 15-30 min segunda fase), sendo considerado tempo zero o momento imediatamente após a administração da formalina. A primeira fase se caracteriza por dor neurogênica e a segunda fase se caracteriza pela dor inflamatória, o qual representa a resposta mais forte à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória com liberação de mediadores. Entre as duas fases se diz que não há manifestação de estímulos, que denominamos quiescência (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente utilizando ANOVA *one-way* seguido do pós teste de Bonferroni, Tukey ou Dunnett, quando apropriado. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

Resultados

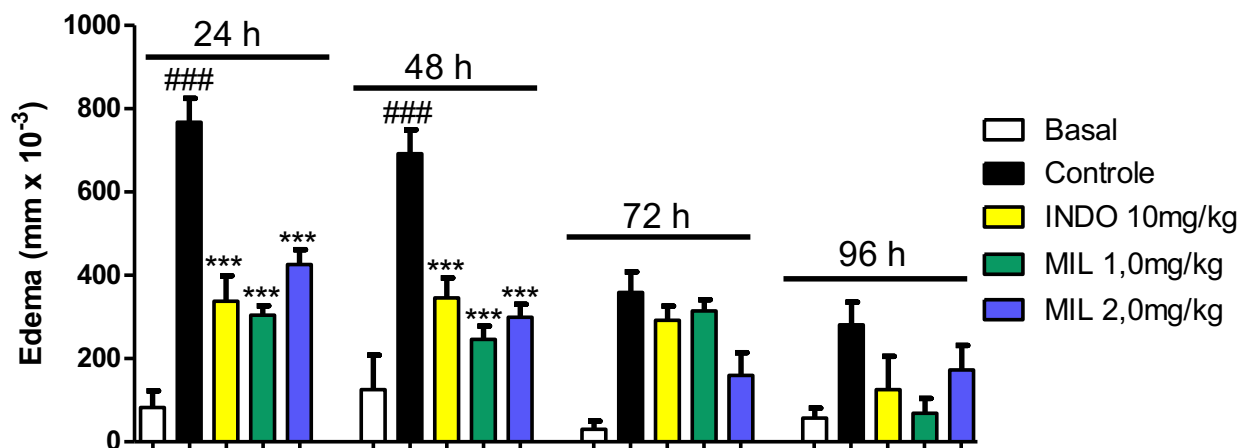
4. RESULTADOS

4.1. Atividade anti-inflamatória da milonina

4.1.2. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é um componente presente na parede de bactérias gram-negativas, que em contato com receptores presentes nas membranas citoplasmática das células do sistema imune induz o processo inflamatório. No gráfico 1 observa-se que o LPS induziu, de maneira significativa ($p<0,001$), o edema na pata dos animais do grupo controle (LPS) em relação aos animais do grupo basal. A indometacina (INDO 10mg/kg), anti-inflamatório não esteroide, utilizado como droga de referência, inibiu, de forma significativa ($p<0,001$), em 56% e 50,1% a formação do edema de pata nos tempos 24h e 48h após o estímulo, respectivamente. A milonina, nas doses de 1,0 ou 2,0mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,001$) o edema em 60,2% e 64,3% e em 44,5% e 56,69%, respectivamente, nos intervalos de 24h e 48h, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle (LPS). Entretanto, nos tempos mais tardios de 72h e 96h, não houve redução significativa para nenhum dos grupos tratados após a indução do edema com o agente flogístico. Mas, foi observada nesses intervalos uma redução do edema no controle (LPS).

Gráfico 1. Efeito antiedematogênico da milonina induzido por LPS

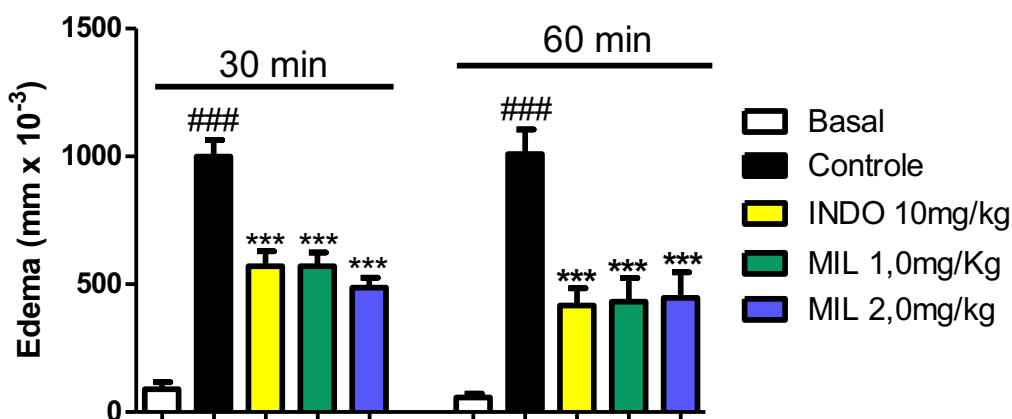


Camundongos Swiss (n=7) receberam injeções intraplantar (20µl) de LPS (25µg/pata) na pata traseira esquerda e PBS, com o mesmo volume, na pata traseira direita 1h após o tratamento oral com Milonina 1,0mg/kg ou 2,0mg/kg, Indometacina (10mg/kg) ou veículo (grupo controle). O grupo basal (PBS) foi desafiado apenas com PBS em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h após o estímulo com o LPS. Os gráficos representam a média ± E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. ### $p < 0.001$ comparação entre grupo controle e basal; *** $p < 0.001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

4.1.3. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por prostaglandina E₂ (PGE₂)

A prostaglandina, um importante mediador inflamatório responsável por induz a dor e o extravasamento de líquidos para o local do estímulo. No gráfico 2, é possível observar a resposta edematogênica induzida pela aplicação intraplantar de PGE₂, o qual ficou evidente nos tempos de 30 min e 60 min em relação ao grupo basal. A droga padrão anti-inflamatória, a indometacina, inibiu o processo inflamatório com redução significativa ($p < 0,001$) em 40,6% e 58,7% nos tempos avaliados. Esse resultado é semelhante ao da droga testada nas duas doses MIL 1,0 e MIL 2,0, em que houve redução respectivamente em 40,5% e 49,3% para 30 min e 49,13% e 55,73% para 60 min, em relação ao grupo controle (PGE₂).

Gráfico 2. Efeito antiedematogênico da milonina induzido por prostaglandina E₂

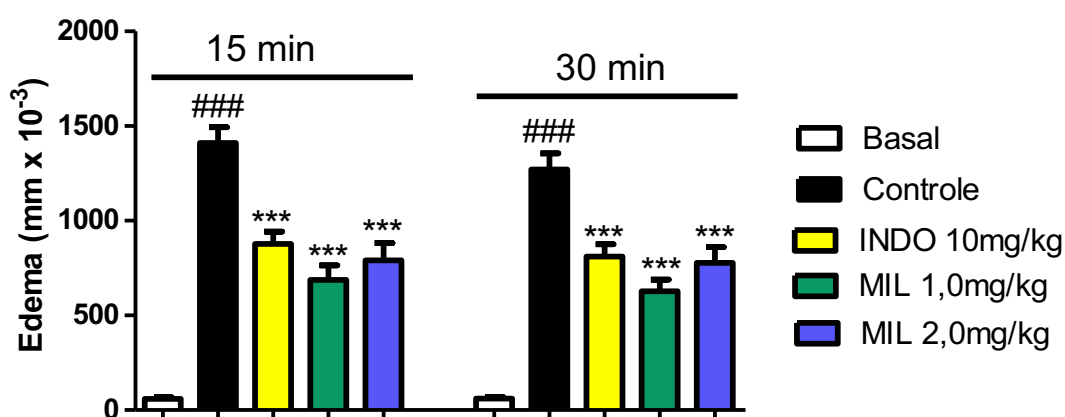


Camundongos Swiss (n=7) receberam injeções intraplantar (20µl) de prostagladina (PGE₂; 5µg/pata) na pata traseira esquerda e PBS com o mesmo volume na pata traseira direita 1h após o tratamento oral com Milonina 1,0 ou 2,0, Indometacina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal (PBS) foi desafiado apenas com PBS em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 30 e 60 min após o estímulo com o PGE₂. Os gráficos representam a média ± E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$ comparação entre grupo controle e basal; *** $p < 0,001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

4.1.4. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por bradicinina (BK)

A bradicinina (BK), mediador inflamatório, foi utilizada para induzir o edema de pata nos camundongos. O gráfico 3 mostra que a injeção intraplantar de BK induziu aumento significativo ($p<0,001$) no diâmetro da pata dos animais nos tempos de 15 e 30 min quando comparados ao grupo basal. Em adição, observou-se redução significativa ($p<0,001$) do edema em 39,8% 51,25% e 49,63% no tempo de 15 min e 32,05%, 50,7%, 38,8% no tempo de 30 min nos grupos de animais tratados com INDO 10mg/kg, MIL 1,0mg/kg e MIL 2,0mg/kg, respectivamente.

Gráfico 3. Efeito antiedematogênico da milonina induzido por bradicinina

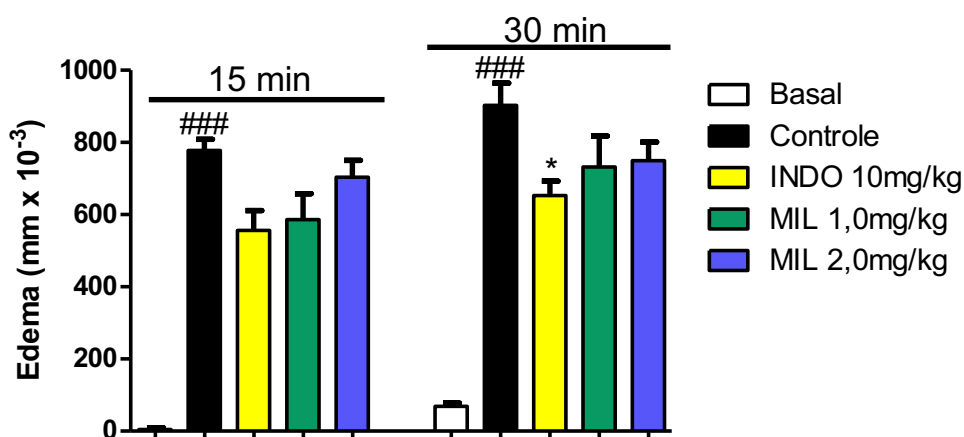


Camundongos Swiss (n=7) receberam injeções intraplantar (20µl) de Bradicinina (BK;6nmol/pata) na pata traseira esquerda e PBS com o mesmo volume na pata traseira direita 1h após o tratamento oral com Milonina 1,0mg/kg ou 2,0mg/kg, Indometacina (10mg/kg) ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com PBS em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 15 e 30 min após o estímulo com o bradicinina. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. ### $p<0,001$ comparação entre grupo controle e basal; *** $p<0,001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

4.1.5. Efeito anti-inflamatório da milonina no edema de pata induzido por serotonina (5-Hidroxitriptamina - 5HT)

A serotonina, mediador inflamatório pré-formado, armazenado em grânulos celulares, é um dos primeiros mediadores a ser liberado durante o processo inflamatório. O gráfico 4 mostra que a 5-HT (controle) quando administrada na pata dos camundongos e sem tratamento induziu de forma significativa a formação do edema em relação ao grupo basal. Os tratamentos orais com a milonina (1,0 ou 2,0mg/kg), 1 hora antes do desafio com o agente flogístico, não foi capaz de reduzir significativamente o edema induzido por 5-HT nos tempos avaliados, entretanto, a droga padrão diminuiu significativamente ($p<0,05$) no tempo de 30 min.

Gráfico 4. Efeito antiedematogênico da milonina induzido por serotonina



Camundongos Swiss ($n=7$) receberam injeções intraplantar (20 μ l) de 5-HT (1%, p/v) na pata traseira esquerda e PBS com o mesmo volume na pata traseira direita 1h após o tratamento oral com milonina 1,0mg/kg ou 2,0mg/kg, Indometacina (10mg/kg) ou veículo (grupo controle). O grupo basal (PBS) foi desafiado apenas com PBS em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 15 e 30 min após o estímulo com o serotonina. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. ### $p<0,001$ comparação entre grupo controle e basal e * $p<0,05$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

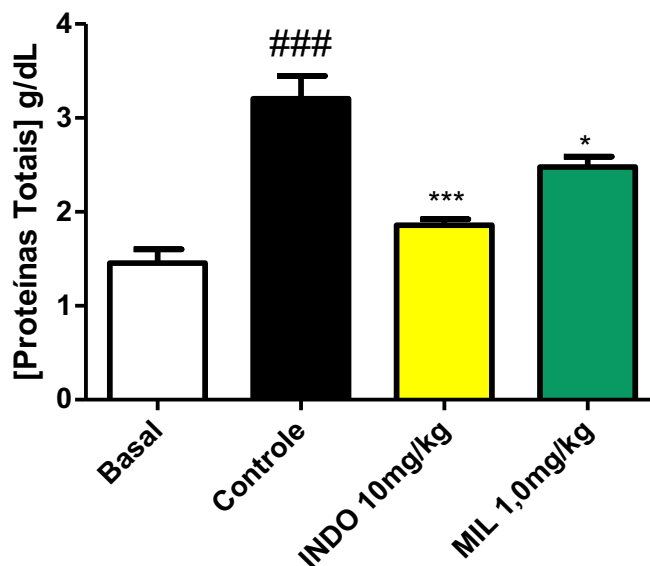
4.1.6 Efeito anti-inflamatório da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético

As doses de milonina (1,0 mg/kg ou 2,0 mg/kg) utilizadas nos tratamentos dos animais desafiados com os diferentes agentes flogísticos não apresentaram diferenças significativas quanto a diminuição dos edemas, portanto, a dose de 1,0mg/kg foi escolhida para dar continuidade aos estudos.

A liberação de mediadores inflamatórios por estímulos causa aumento da permeabilidade vascular, fenômeno característico da inflamação aguda que leva a formação do edema, pois permite o extravasamento do líquido presente nos vasos (exsudato) para o interstício. O ácido acético é um agente irritante vascular que promove permeabilidade vascular e utilizada, para esse fim, e é um modelo experimental utilizado para testes de moléculas com possíveis efeitos sobre o endotélio.

No gráfico 5 observa-se aumento do extravasamento de proteínas totais, no sítio inflamado induzido pelo ácido acético (controle) em relação ao grupo basal. Entretanto os tratamentos orais, dos animais, com a droga padrão, indometacina e a molécula teste, milonina induziram redução significativa ($p<0,001$; $p<0,05$) no extravasamento de proteínas para o sítio inflamado de 41,94% e 31,44%, respectivamente, em relação ao grupo de animais controle, que não tiveram tratamento.

Gráfico 5. Efeito da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético



Camundongos Swiss (n=7) receberam na cavidade peritoneal (300µl) de ácido acético (0,6%) 1h após o tratamento oral com milonina 1,0mg/kg, Indometacina (10mg/kg) ou veículo (controle). O grupo basal foi desafiado apenas com PBS (300µl). Após 20 min do estímulo com ácido acético, foi realizado o lavado peritoneal para quantificar o extravasamento vascular. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. das densidades ópticas do lavado peritoneal, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ### $p < 0,001$ comparação entre grupo controle e basal; *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

4.1.7. Análise histológica do pré-tratamento com a milonina no teste de permeabilidade microvascular induzida pelo ácido acético

Após a leitura do teste de permeabilidade induzida com ácido acético, amostras do peritônio dos animais foram coletadas para análise histológica, afim de caracterizar o perfil inflamatório no peritônio dos animais, os quais estão representados na figura abaixo (4A-D).

Nas imagens obtidas pela objetiva de 10x coradas, na microscopia óptica, dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina observa-se que o grupo A (basal) apresentou normalidade na apresentação e distribuição das fibras dentro dos feixes vasculares. Nos animais controle (B) evidencia o edema no interior do feixe vascular (triângulo) e, entre os feixes vasculares constituintes do músculo que é observado de forma transversal (estrela) visto visualmente como dissecação ou separação dos feixes musculares lisos devido ao aumento da permeabilidade microvascular que culmina no extravasamento de líquido e edema do tipo transudato.

No grupo de animais tratados com a indometacina (10mg/kg) (C) observa-se manutenção da estrutura morfológica normal, não apresentando edema nem qualquer outra alteração morfológica de reflexo histopatológico. O grupo tratado com a milonina (1,0mg/kg) (D) se apresentou de forma semelhante, morfológicamente, ao grupo tratado com a droga padrão, não se observa a presença de parâmetros inflamatórios.

Figura 4. Análise histológica da milonina na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético

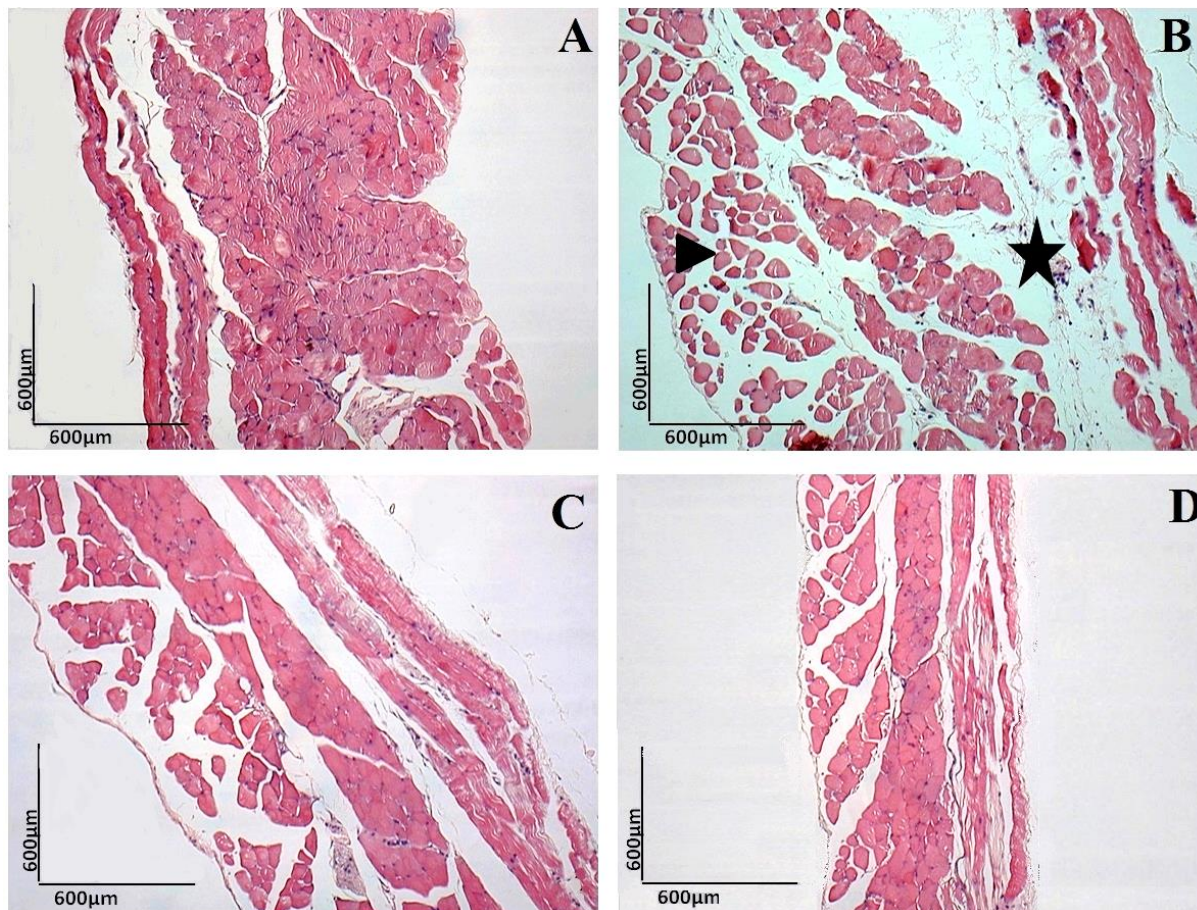


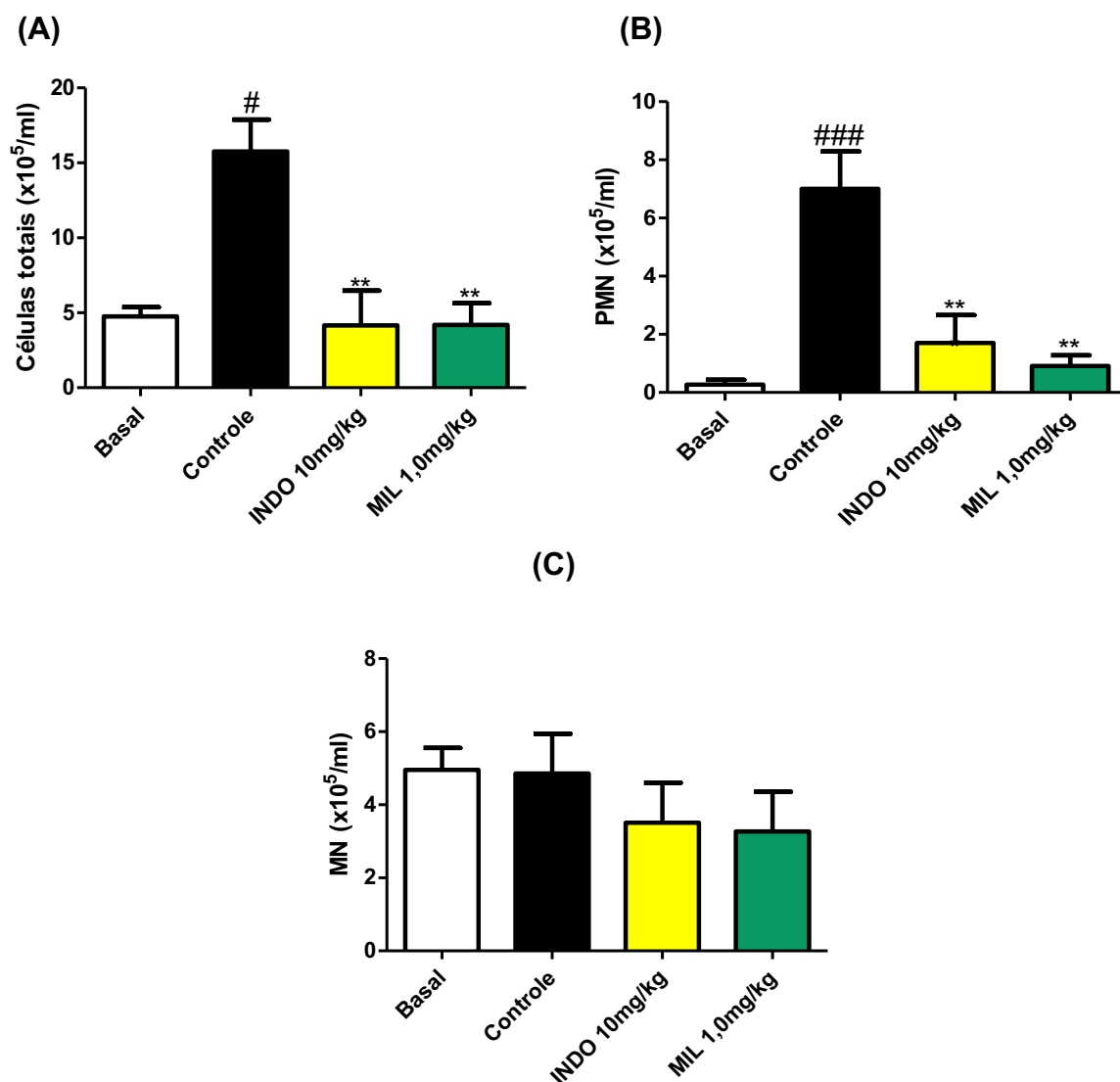
Figura 4. Histologia do peritônio de camundongos submetidos ao modelo de permeabilidade microvascular induzida com ácido acético. A: Histologia do peritônio do grupo basal, tratado e desafiado apenas com PBS (H/E, 10x). B: Fotomicrografia de peritônio em animal controle que foi tratado com PBS e desafiado com ácido acético (0,6%) (H/E, 10x) C: Histologia do peritônio do grupo tratado com indometacina (10mg/kg) e desafiado com ácido acético (0,6%). D: Fotomicrografia do grupo tratado com milonina (1,0mg/kg) e desafiado com ácido acético (0,6%) (H/E, 10x).

4.1.8. Efeito anti-inflamatório da milonina na celularidade total e diferencial na peritonite induzida por carragenina

Para quantificar a migração leucocitária para a cavidade peritoneal utilizou-se o modelo de peritonite induzida pela carragenina. No gráfico 6A, observa-se que os tratamentos com a droga padrão INDO (10mg/kg) ou com a MIL (1,0mg/kg) diminuiram significativamente ($p<0,01$) o número de células totais, na cavidade peritoneal, 76,4% e 73,5%, respectivamente quando comparadas ao grupo controle (carragenina).

Entretanto, o gráfico 6B mostra que o número de polimorfonucleares (PMN) que migraram para cavidade peritoneal, principalmente de neutrófilos, após a indução com a carragenina foi drasticamente e significantivamente diminuído com os tratamentos INDO (10mg/kg) ou MIL (1mg/kg) correspondendo a uma redução de 75,65% e 86,91%, respectivamente, em relação ao grupo controle. Como já esperado o número células mononucleares (MN) (gráfico 6C), não houve alterações quando comparadas com o grupo controle.

Gráfico 6. Efeito da milonina na peritonite induzida por carragenina



Camundongos Swiss (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 μ l) de carragenina (1%) 1h após o tratamento oral com Milonina 1,0mg/kg ou Indometacina (10mg/kg) ou veículo (controle). O grupo basal foi desafiado apenas com PBS (300 μ l). Após 4 h do estímulo com carragenina foi realizado o lavado peritoneal para determinar a celularidade total (A) e diferencial, onde foi realizado a diferenciação entre polimorfonucleares (PMN) (B) e mononucleares (MN) (C). O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da contagem total e diferencial do lavado peritoneal, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ### $p < 0,001$ e # $p < 0,05$ para comparação entre grupo controle e basal; ** $p < 0,01$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

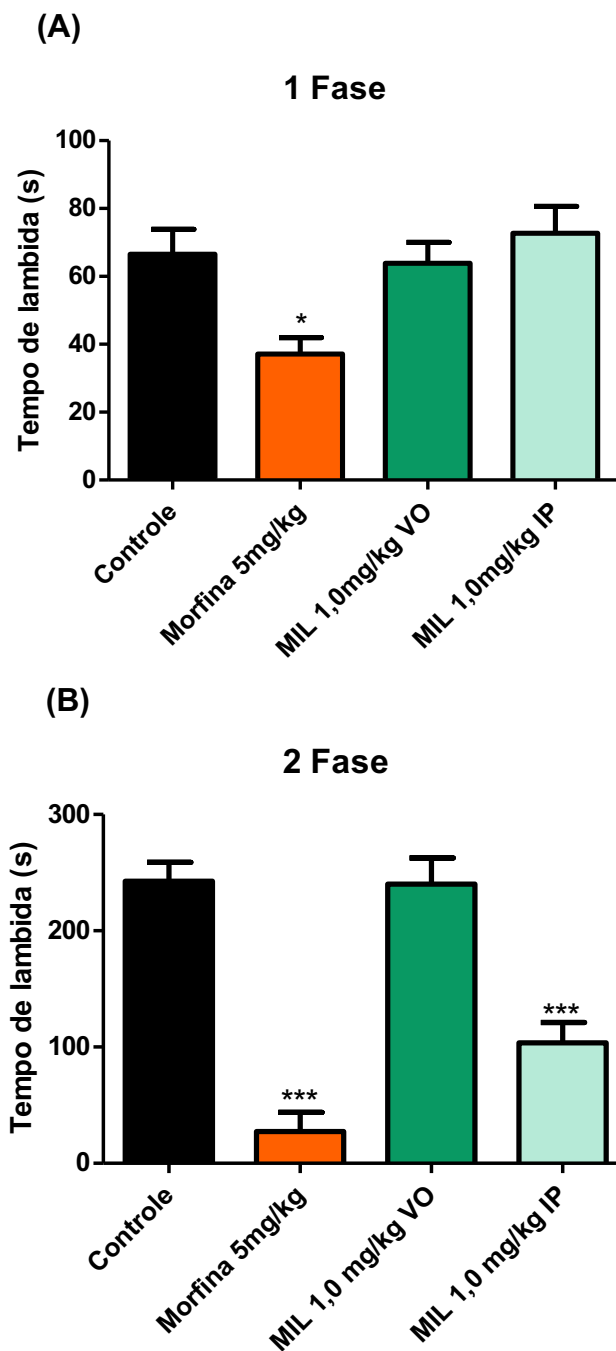
4.2. Atividade antinociceptiva

4.2.1. Efeito analgésico da milonina induzido pela formalina

O teste da formalina permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva por uma injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do camundongo. Esse teste se apresenta em duas fases: 1° nocicepção neurogênica (0-5 min) e 2° nocicepção inflamatória (15-30 min).

O gráfico 7 representa o resultado preliminar de nocicepção, em que a morfina utilizada como droga de referência apresentou diminuição nos parâmetros de nocicepção em ambas as fases 1 e 2, correspondendo a uma diminuição de 64,34% e 83,2% respectivamente, em relação ao controle (formalina). Tendo em vista que a milonina é um alcaloide morfinâmico pertencente a mesma classe da morfina, acrescentamos um grupo pela mesma via de administração da morfina (i.p). Na primeira fase, os grupos de animais tratados com a milonina por via oral ou intraperitoneal 1 h antes do desafio flogístico, não apresentaram diminuição nos parâmetros de nocicepção. Entretanto, quando se observou os efeitos na segunda fase, a milonina administrada intraperitonealmente promoveu redução significativa ($p < 0,001$) de 62,1%, em comparação ao grupo controle, na nocicepção representada pela “dor” inflamatória.

Gráfico 7. Efeito da milonina no teste da formalina na pata dos animais



Camundongos Swiss (n=7) receberam injeções intraplantar (20µl/animal) de formalina (1%), após 60 minutos de tratamento com milonina (1mg/kg; v.o.), ou com igual volume de salina (v.o), milonina (1mg/kg; i.p) ou droga padrão morfina (5 mg/kg; i.p.). Após o estímulo foi observado a nocicepção nos tempos de lambida na 1 fase (A; “dor” neurogênica, 0 – 5 min) e 2 fase (B; “dor” inflamatória, 15 – 30 min). O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da analgesia induzida pela formalina, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Há, ao redor do planeta, uma vasta quantidade de plantas medicinais que tem sido alvo de testes no sentido de avaliar os mecanismos de ação em alvos biológicos, com o propósito de desenvolver medicamentos para diversas doenças com poucos efeitos colaterais. A investigação dos mecanismos de ação de diversos extratos de plantas bem como o processo de isolamento de moléculas com princípios ativos responsáveis pelos efeitos desejáveis são os princípios fundamentais dos estudos em farmacologia (COSTA *et al.*, 2012; PETROVSKA, *et al.*, 2012).

A indústria terapêutica tem trabalhado com, aproximadamente, 25 a 30% de produtos naturais ou derivados deles, em relação a todos os fármacos que são produzidos (CALIXTO, 2003). Estudos têm mostrado que, para algumas enfermidades de difícil tratamento, os produtos naturais são as fontes mais investigadas com o propósito de obter novas substâncias eficazes para o controle dessas enfermidades (JI, LI & ZHANG, 2009).

Dentre as plantas medicinais estudadas estão as da família Menispermaceae. Essa família apresenta vários gêneros com várias espécies com uma ampla variedade de atividades biológicas. Dentre os gêneros dessa família está o gênero *Cissampelos* que possui aproximadamente 520 espécies (JACQUES & BERTULINO, 2008). Tem-se estimado que a família Menispermaceae possui mais de 1.525 compostos alcalóidicos isolados de aproximadamente 159 espécies diferentes (MOURA, 2009; BARBOSA-FILHO, LEITÃO & GRAY, 2000) e que apresentam atividades biológicas distintas, especialmente anti-inflamatórias (AMRESH *et al.*, 2004; ALEXANDRE-MOREIRA *et al.*, 2003; ALVES, 2016), antinociceptiva (LEITE *et al.*, 2014), antimalárica (MILLIKEN, 1997), antidepressiva (ALMEIDA *et al.*, 1998) e antialérgica (BEZERRA-SANTOS, *et al.*, 2006).

A espécie, pertencente a essa família, *Cissampelos sympodialis* Eichl possui, entre suas indicações populares, efeito sobre processos inflamatórios principalmente a nível de trato respiratório. Estudos realizados com seus extratos (raízes e folhas) e com seus compostos isolados demonstram tais efeitos (PIUVEZAM *et al.*, 1999; BATISTA-LIMA *et al.*, 2001; ALEXANDRE-MOREIRA *et al.*, 2003; BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2004; BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008; CERQUEIRA-LIMA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014). Para compreender melhor este efeito, neste trabalho investigamos os efeitos da milonina, um dos alcaloides isolado de *C. sympodialis* (Menispermaceae) nos modelos experimentais de inflamação aguda e analgésica.

Um dos parâmetros utilizados para avaliar os processos inflamatórios é o edema. Desse modo, há modelos inflamatórios que utilizam esse sinal cardinal para avaliar a atividade de fármacos com propriedades anti-inflamatórias.

Nesse estudo, utilizamos modelo de edema de pata induzida por LPS, o componente majoritário da parede celular de bactérias gram-negativas. O LPS induz a ativação do sistema imune inato pelo reconhecimento de padrões moleculares de patógenos (PAMPS) pelos receptores celulares do tipo Toll 4 (TLR) levando à produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 que atuam sobre os vasos (AKIRA & TAKEDA, 2004; TAKEUCHI & AKIRA, 2010) e à liberação de mediadores inflamatórios fundamentais tais como histamina e prostaglandinas que atuam nos vasos ocasionando a vaso dilatação com aumento de permeabilidade celular e extravasamento de líquidos (exsudato) para o sítio inflamado (GLASS *et al.*, 2010).

Diante disso, o tratamento com milonina, alcaloide morfinâmico de *C. sympodialis*, no modelo inflamatório induzido por LPS promoveu inibição na formação do edema em até 48h. Entretanto, dois outros alcaloides da planta, a warifteína e metil-warifteína não promoveram a inibição desse sinal cardinal da inflamação (COSTA, 2013).

Os resultados inibitórios obtidos com milonina sobre o edema induzido por LPS foi também obtido com a curina, um alcaloide isolado da espécie *Chondodendron platyphyllum* da mesma família Menispermaceae (LEITE *et al.*, 2014) indicando, portanto, que alcaloides podem estar agindo sobre as células do tecido inflamado impedindo que as mesmas produzam mediadores inflamatórios tais como citocinas bem como inibam a liberação de mediadores tais como histamina.

Tendo observado a atividade antiedematogênica do pré-tratamento da milonina no edema de pata induzido pelo LPS nas primeiras horas após o estímulo com o agente flogístico, analisamos seu efeito sobre os possíveis mediadores inflamatórios para assim elucidar os mecanismos de ação envolvidos. Dessa forma, a fase inicial da inflamação é principalmente mediada por PGE₂, BK e 5-HT (serotonina), os quais foram utilizados, isoladamente, na indução do edema de pata.

A PGE₂ pertencente ao membro da família dos eicosanoides e é oriunda da quebra do ácido araquidônico pela cicloxigenase (COX). Esse prostanóide, quando liberado, exerce importantes funções no processo inflamatório via a ativação de receptores (EP), principalmente EP₃, acoplados à proteína G (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011) nas células envolvidas no sítio inflamado. Uma vez ativados, os receptores, por sua vez, ativam cinases que estimulam a transcrição de fatores pró-inflamatórios, desencadeiam a dor e ainda estão

relacionados à presença de febre em doenças inflamatórias. Em adição, a injeção de PGE_2 no tecido produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular com formação do edema (KINGSTON & GREAVES, 1985; WILLIAMS & MORLEY, 1973).

Os resultados obtidos no edema de pata induzido pela injeção de PGE_2 em camundongos pré-tratados com milonina mostraram que o alcaloide foi capaz de inibir a formação do edema de pata quando comparado com os animais não tratados mas desafiados com PGE_2 (grupo controle). Resultados semelhantes foram observados com os alcaloides crotalaburnine (de semente de *Crotalaria laburnifolia* Linn), curina (*Chondodendron platyphyllum*) e warifteína (*C. sympodialis*). Entretanto, a metilação natural da warifteína (metilwarifteína) não foi capaz de inibir o edema de pata induzido por PGE_2 (GHOSH & SINGH, 1974; LEITE 2014; COSTA, 2013). Esses resultados mostram que alcaloides inibem diretamente a PGE_2 na formação de edema.

A bradicinina (BK), proteína presente no sistema das cininas, que tem ação pró-inflamatória, promove a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, alterações celulares e hiperalgesia (CAMPOS & CALIXTO, 1995; MAURER, *et al.*, 2011). A BK também atua conduzindo ações intrínsecas ao processo inflamatório, estimulando neurônios que liberam neuropeptídeos, como a substância P, provocando a algesia (CALIXTO, CABRINI & FERREIRA, 2000). Em adição, a BK ativa a fosfolipase A_2 liberando ácido araquidônico, a produção de citocinas como IL-1 β e TNF α em células inflamatórias. Estudos relatam que receptores do tipo B_1 , que são ativados ao interagirem com a BK, estão sendo apontados como envolvidos na formação e na manutenção dos sinais cardinais da inflamação aguda (CAMPOS & CALIXTO, 1995).

A milonina reduziu a formação do edema de pata induzido pela BK de maneira semelhante à droga padrão indometacina, um clássico inibidor da COX. Assim, podemos sugerir que a milonina, ao inibir a bradicinina, impede a ligação da mesma aos receptores B_1 , impedindo consequentemente a mobilização do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas e leucotrienos, dois importantes mediadores inflamatórios lipídicos que realizam a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular e formação do exsudato.

Os resultados com a milonina sobre o edema induzido pela BK são similares aos encontrados com o alcaloide epiisopiloturine (*Pilocarpus microphyllus*) e warifteína (*C. sympodialis*), onde o pré-tratamento com esses alcaloides em camundongos, 30 min e 1h antes do desafio com a BK, respectivamente, foram capazes de inibir a formação de edema de pata (SILVA *et al.*, 2013; COSTA, 2013). Como os alcaloides acima mencionados são de classes diferentes sugerimos que os efeitos antiedematogênicos observados podem estar relacionados a uma inibição de ativação celular no sítio inflamado impossibilitando os efeitos

do agente flogístico sobre as células.

Em suma, os resultados apresentados até o presente demonstram que a milonina inibiu a ação da PGE_2 e BK, podendo exercer seu efeito sobre bloqueios de receptores nas células ou ainda via bloqueios de alguns pontos nas vias de sinalizações induzidas pelos agentes flogísticos.

Outro mediador inflamatório liberado no sítio inflamado e que induz edema é a 5-HT, mediador encontrado, abundantemente, nas células enterocromafins do trato gastrointestinal. Entretanto, já foram relatadas reservas desse mediador em plaquetas, células do sistema nervoso central e mastócitos (murinos) (NAGATA *et al.*, 2001). Quando liberada por células inflamatórias, a 5-HT atua em diversos estágios do processo inflamatório, como nas alterações vasculares, com aumento da permeabilidade e promove direta ou indiretamente o recrutamento de leucócitos. Os receptores serotoninérgicos, tais como 5HT-1 e 5-HT3, foram descritos por estarem associados sobre a modulação da degranulação de mastócitos (SHAJIB & KHAN, 2015; THEOHARIDES *et al.*, 2012). Dessa forma, este mediador está atuando na fase inicial do processo inflamatório.

O pré-tratamento com milonina nos animais desafiados com a 5-HT não promoveu inibição da formação do edema de pata, portanto não atua nas vias de sinalização induzidas por 5-HT. Entretanto estudos realizados no laboratório de Imunofarmacologia demonstraram que a milonina inibe degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 (Alves, 2016) sugerindo que o alcaloide, embora não inibe os efeitos da 5-HT, de maneira direta, interfere na sua liberação destes pelos mastócitos.

Como conclusões parciais desse estudo, inferimos que a milonina reduz a vasodilatação e permeabilidade vascular durante a resposta inflamatória aguda, inibindo a atividade da PGE_2 e BK, independente da ação da 5-HT sugerindo, portanto, que o efeito antiedematogênico da milonina ocorre no início do processo inflamatório, visto que esses mediadores são preponderantes na fase inicial do processo. Em adição, sugerimos que esse efeito ocorra nas vias intracelulares, pois os receptores da PGE_2 que são do tipo GPCR, estão ligados a proteína $G\alpha_s$ e ativam a adenilato ciclase e os receptores B1 e B2 da BK estão associados a proteína $G\alpha_i$ e $G\alpha_q$, respectivamente (EHRENFELD *et al.*, 2012) assim, a milonina pode estar atuando na via de sinalização $G\alpha$ e inibindo a via de sinalização $G\alpha_i$, o que poderia explicar a inibição do edema pelos mediadores PGE_2 e BK.

Os dados acima descritos apontam que a milonina inibe os efeitos de mediadores que atuam nas fases iniciais do processo inflamatório levam ao edema, portanto, para melhor esclarecer o efeito da milonina sobre esse sinal cardinal da inflamação utilizamos o

modelo experimental de permeabilidade vascular induzida com ácido acético, o qual permite quantificar o influxo de fluido (exsudato) para o foco inflamatório (KOU *et al.*, 2005).

O ácido acético, quando injetado (i.p), induz contorções abdominais e o extravasamento de líquidos ricos em proteínas devido à liberação de vários mediadores presentes no processo inflamatório, como PGE_2 , BK e citocinas, entre outros, sendo um modelo também utilizado no estudo de mecanismos antinociceptivos (KOU *et al.*, 2005; IKEDA *et al.*, 2001). Uma substância que iniba o extravasamento de fluidos pode colaborar para a redução tanto da formação de edema, como para a migração de leucócitos para o sítio inflamado. Dessa forma, observamos que a milonina administrada antes da injeção (i.p.) de ácido acético preveniu o extravasamento de proteínas para a cavidade peritoneal e consequentemente reduziu o edema demonstrando claramente seu efeito sobre a vasculatura que ladeia o sítio inflamado.

A análise histológica do peritônio dos animais tratados com milonina e desafiados com o ácido acético demonstrou diminuição do edema do tipo transudato entre os feixes pelo espaçamento das fibras musculares lisas observados no peritônio dos animais controle (não tratados), portanto o tratamento com a milonina promoveu a preservação dessas estruturas. Essa análise histológica corrobora com os dados que relacionam a atividade antiedematogênica da milonina e sua ação inibitória sobre PGE_2 e BK.

Os alcaloides de *C. sympodialis*, warifteína e metil-warifteína, reduziram o extravasamento de proteínas totais no peritônio de camundongos desafiados com o ácido acético, devido à redução da ativação dos canais de Ca^{2+} e K^+ , uma vez que o ácido acético provoca ativação de desses canais iônicos (COSTA, 2013). Estudos posteriores poderão demonstrar se milonina age de forma semelhante aos alcaloides encontrados na planta.

O aumento da permeabilidade vascular no sítio inflamado culmina no extravasamento de líquidos (exsudato), bem como com o influxo de células polimorfonucleares e mononucleares tendo em vista a migração de células no sítio inflamado, investigamos o efeito da milonina sobre a migração leucocitária e para tal, utilizamos o modelo experimental de peritonite utilizando o agente flogístico a carragenina.

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas que quando injetada no peritônio de um animal induz um processo inflamatório local que, por sua vez, envolve a liberação sequencial de mediadores como histamina, serotonina, tromboxanos, cininas, prostaglandinas, agentes quimiotáticos e, principalmente os leucotrienos (VINEGAR, 1969; WILHELM, 1973; BRAY *et al.*, 1981).

Durante a migração de leucócitos para o sítio inflamado, os fenômenos celulares se apresentam em fases como marginação e rolamento, aderência e processo de passagem de leucócitos entre as células endoteliais (diapedese) para o foco inflamatório (MULLER, 2011). Alguns fármacos com efeitos anti-inflamatórios podem diminuir a migração desses leucócitos pelo bloqueio de algumas dessas fases, ou pela inibição da síntese de mediadores quimiotáticos, tais como, citocinas (TNF- α e IL-1 β), PAF, componentes do sistema complemento (C5a) e produtos da via da lipoxigenase (LTB₄) (GENG, 2001; MACKEY, 2008).

Portanto, o pré-tratamento com a milonina no modelo de peritonite induzida com carragenina induziu a redução no número total de leucócitos para cavidade peritoneal em especial os polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos, sem alterar o número de células mononucleares, corroborando assim o efeito anti-inflamatório da milonina.

Alguns alcaloides como a caulerpina, extraída de algas marinhas, a epiisopiloturine e a riparina II também apresentaram inibição da migração de leucócitos no modelo de peritonite induzido por carragenina (SOUZA *et al.*, 2009). Esses dois últimos alcaloides atuaram diminuindo a ação da mieloperoxidase, uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos, que é liberada, no espaço extracelular, após a ativação de leucócitos, sendo considerado um marcador de migração de neutrófilos (SILVA; CARVALHO, 2013).

Em adição, a dor ou nocicepção, um dos seus sinais cardinais da inflamação pode ser mensurada por modelos experimentais. A dor está associada aos receptores de nocicepção (nociceptores) que quando ativados promovem a transmissão do estímulo até o sistema nervoso central que possibilita informações sobre a lesão dos tecidos (TRACEY, 2002). Tecidos lesionados liberam mediadores (PGE, BK e citocinas) que atuam sensibilizando estruturas periféricas que estão relacionadas a dor inflamatória (SINGH *et al.*, 2012).

Considerando que a milonina está relacionada com a inibição da PGE₂ e BK, que atuam no desenvolvimento da dor, nos modelos experimentais acima mencionados testamos o efeito analgésico do alcaloide frente a um modelo experimental de nocicepção com injeção intraplantar de formalina. A formalina induz, nos animais as duas fases da nocicepção. A primeira fase é denominada neurogênica, começa imediatamente após a injeção intraplantar de formalina, sendo de curta duração, e se caracteriza pela liberação de mediadores como serotonina, substância P, histamina e cininas. A segunda fase é denominada inflamatória, é mais persistente e duradoura devido à inflamação local, que causa a liberação e/ou produção de mediadores como histamina, serotonina, PGE, NO,

aminas simpáticas, BK e citocinas (Tjølsen et al., 1992; CHICHORRO, LORENZETTI & ZAMPRONIO, 2004).

No teste da formalina, substâncias analgésicas apresentam ações diferenciadas na fase neurogênica e na fase inflamatória. Neste teste, os opióides, como o alcaloide morfina e a codeína, atuam de forma central (fase neurogênica) reduzindo tempo de lambertura da pata (parâmetro em análise) em resposta à formalina, o mesmo ocorrendo também na segunda fase (inflamatória). Entretanto, os analgésicos não opiáceos, como a indometacina (exemplo de AINE), possuem ação periférica inibindo apenas a segunda fase do teste (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Na primeira fase de nocicepção do teste da formalina, a milonina (1mg/kg) não interferiu nos sinais dolorosos em camundongos submetidos ao teste. Sendo este resultado compatível com o resultado obtido por Alves (2016) o qual demonstrou que a milonina não atua na nocicepção nos camundongos submetidos ao teste da placa quente indicando que a milonina não interfere diretamente no sistema nervoso central. E semelhante ao observado no estudo de Carvalho (2013), quando o alcaloide riparina II não foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo nesta primeira fase. Por outro lado, na fase inflamatória, apenas a milonina por via i.p. conseguiu reduzir significativamente (62,1%) a nocicepção nos animais semelhante ao resultado da morfina, indicando que o efeito antinociceptivo do alcaloide depende de ações que interfiram no processo inflamatório provavelmente via inibição na produção de PGE_2 e BK.

Portanto, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram o potencial anti-inflamatório do alcaloide milonina isolada de *C. sympodialis* em modelos experimentais de inflamação aguda, principalmente nas fases iniciais do processo inflamatório. Esse efeito está, provavelmente, relacionado com a inibição da liberação dos mediadores PGE_2 e BK e sua atuação na segunda fase (dor inflamatória) no modelo experimental de nocicepção. Entretanto, novos experimentos devem ser realizados para o melhor entendimento dos mecanismos de ação da milonina na inflamação.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a milonina:

- Apresentou atividade anti-inflamatória por inibir os edemas de pata induzidos por LPS, PGE₂ e BK, independente de 5-HT;
- Diminuiu a quantidade de proteínas totais extravasadas no sítio inflamado ocasionado pelo ácido acético, mantendo a morfologia preservada;
- Reduziu a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, para a cavidade peritoneal na peritonite induzida por carragenina;
- Inibiu a segunda fase (dor inflamatória) no modelo de nocicepção induzido por formalina.

Portanto, a milonina, alcaloide isolado de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl, apresenta atividade anti-inflamatória e analgésica e pode vir a ser um potente protótipo para a produção de medicamentos com efeito dual na inflamação.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDIS, C.A. & SIMONS, F.E.R. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **European Journal of Pharmacology**. v.533, n. (1-3), p. 69–76, 2006.

AKIRA, S. & TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**. v.4, n.7, p. 499-511, 2004.

ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; TRINDADE, M.N.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; PIUVEZAM, M.R. & PEÇANHA, L.M.T. Modulation of B lymphocyte function by an aqueous fraction of the ethanol extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.36, n.11, p. 199-205, 2003.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; DE ASSIS, T.S.; DE MEDEIROS, I.A. & THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of ethnopharmacology**. v.63, n.3, p. 247-252, 1998.

ALVES, AF. Milonina alcalóide de *Cissampelos sympodialis* EICHL (Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócitos. 2016. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

AMRESH, G.; REDDY, G.D.; RAO, C.H.V. & SHIRWAIKAR, A. Ethnomedical value of *Cissampelos pareira* extract in experimentally induced diarrhoea. **Acta Pharmaceutica**. v.54, n.1, p. 27–35, 2004.

AOKI, T. & NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.33, n.6, p. 304- 310, 2012.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S. & BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**. v.6, n.1, p.1-6, 2005.

ATANASOV, A.G.; WALTEBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E-M.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**. v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.

BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, N. & THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e Cultura, journal of brazilian association for the advancement of Science**. v.49, n.5-6, p. 386-394, 1997.

BARBOSA-FILHO, J.; LEITÃO DA-CUNHA, V.; & GRAY, Al. Alkaloids of the menispermaceae, **Alkaloids: Chemistry and Biology**, p. 1–190, Academic Press, 2000.

BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. & O’GARRA, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. **Nature immunology**. v.13, n.10, p. 925-931, 2012.

BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. & PAGE, C.P. Inflammatory mediators and asthma: an update. **Pharmacology Reviews**. v.50, n.4, p. 515-596, 1998.

BATISTALIMA, K. V.; RIBEIRO, R. A.; BALESTIERI, F.M.P.; THOMAS, G.; PIUVEZAM, M.R. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* EICHL. (Menispermaceae) leaf extract. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 20, n.OCT/DEC, p. 275-279, 2001.

BEZERRA-SANTOS, C.R. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. *International Immunopharmacology*. 6:1152-1160, 2004.

BEZERRA-SANTOS C.R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine: inhibition of eosinophilic reaction. **International Immunopharmacology**. v.6 n.7, p. 1152-1160, 2006.

BEZERRA-SANTOS C.R., et al. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology** (Print), v.13, n.2, p.148-155, 2012.

Bischoff SC, et al. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **American Journal Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v.296, n.3, p. 685–695, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Medicamentos fitoterápicos. Nota técnica do comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos a respeito do que foi veiculado sobre plantas medicinais e fitoterápicos na imprensa televisiva e escrita no último mês. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Nota+técnica+do+Comitê+Nacional+de+Plantas+Medicinais+e+Fitoterápicos/1d638b87-9843-40d5-962c9b94144e463f?version=1.1>. Acesso: 10/12/16.

BORGES, W.G. Antileucotrienos. **Revista brasileira de Alergia e Imunopatologia**. v.24, n.3, p. 212-219, 2001.

BOZZA P.T, et al. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet activating factor. **European Journal of Pharmacology**. v. 270, n. (2-3), p. 143-9, 1994.

BUCKLEY C.D., et al. The resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v.13, n.1, p. 59-66, 2013.

BUSSE, W.W. Leukotrienes and inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.157, n.6, p. 210-213, 1998.

CALIXTO J.B., et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI M.F. & SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin: part I phenolic compounds. **Planta Medica**. v.69, n.11, p.973-983, 2003.

CAMPOS, M.M. & CALIXTO, J.B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin- induced rat paw oedema. **British Journal of Pharmacology**. v.114, n.5, p.1005-13, 1995.

CARVALHO, A.M.R. Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (o-metil-n-2-hidroxi- benzoil tiramina) em modelos experimentais. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.

CARVALHO, A.M.; et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**. v. 205, n. 3, p.165-72, 2013.

CAVALCANTE, HMM. Atividade espasmolítica em musculatura lisa e citotoxicidade de milonina – um novo alcaloide das folhas de *C. sympodialis* EICHL. 2003, 112f. Dissertação. (Mestrado em produtos naturais) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

CAVALCANTE, H.M., et al. Cardiovascular effects elicited by milonine, a new 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.108, n. 2, p.122-30, 2011.

CHAO, J.; BLEDSOE, G. & CHAO, L. Tissue kallikrein-kinin therapy in hypertension and organ damage. **Progress in Drug Research**. v.69, p.37-57, 2014.

CERQUEIRA-LIMA, A.T.; et al. Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *biomia tropicalis*. **Current Drug Targets**. v. 11, p. 1458-1467, 2010.

CHAE, J.J., et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF- κ B through its N-terminal fragment. **Blood**. v. 112, p.1794-1803, 2008.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B. & ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal Pharmacology**. v.141, n.7, p. 1175–1184, 2004.

COMMINS, S.P.; BORISH, L. & STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**. v.125, n.2, p. S53–S72, 2010.

COOPER, A.M.; MAYER-BARBER, K.D. & SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunology**. v.4, n.3, p. 252-260, 2011.

CORREA, M. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. (Dictionary of Brazilian useful plants and exotic cultivated). **Ministério da Agricultura**, 1984.

COSTA, H.F.; et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **Internacional Immunopharmacology**. v.8, n.4, p. 519-525, 2008.

COSTA, H.F.; et al. Managing murine food allergy with *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) and its alkaloids. **International Immunopharmacology**. v.17, n.2, p. 300–308, 2013.

COSTA, H.F. Investigação do efeito anti-inflamatório dos alcaloides warifteina e metil-warifteina de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) em modelos de inflamação aguda e crônica. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

COSTA, K.C.S. Medicinal plants with teratogenic potential: current considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 48(3): 427-433, 2012.

CUNHA, F.Q.; et al. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology**. v.70, n.1, p. 1-8, 1989.

CUNHA, T.M., et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUSH, J.J. Autoinflammatory Syndromes. **Dermatologic Clinics**. v.31, p. 471-480, 2013.

DE LIRA, G.A.; et al. Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**. v.73, n.4, p. 356-358, 2002.

DI ROSA, I.V.I.; GIROUD, J.P. & WILLOUGHBY, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal Pathology**. v.104, p.15-29, 1971.

DORIGONI, P.A.; et al. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.4, n.1, p. 69–79, 2001.

EHRENFELD, P.; et al. **Signaling pathways coupled to activation of the kinin B1 receptor**. In: Da Silva Xavier G ed. *Advances in Protein Kinases*. 2012: 109–130. InTech.

FARO, M.L.; et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**. v.15, p. 38-47, 2014.

FATKHULLINA, A.R.; PESHKOVA, I.O. & KOLTSOVA, E.K. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. **Biochemistry (Mosc)**. v.81, n.11, p.1358-1370, 2016.

FOGLIO, M.A.; et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**. v.7, 2006.

FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v.33, p. 829–837, 2012.

FRANCESCHI, C. & CAMPISI, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. **The Journals of Gerontology Series a Biological Sciences and Medical Sciences**. v.69, n. S1, p. S4–S9, 2014.

FREITAS, M.R.; ALENCAR, J. & CUNHA, E. Milonine, na 8,14-dihidromorfinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**. v.40, p. 1553-55, 1995.

FREITAS, M.R.; et al. Mechanisms of the contractile effect of the hydroalcoholic extract of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in the rat aorta. **Phytomedicine**. v. 7, p. 63-67, 2000.

FUJITANI Y; et al. Pronounced Eosinophilic Lung Inflammation and Th2 Cytokine Release in Human Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Transgenic Mice. **The Journal of Immunology**. v.168, p.443-449, 2002.

FUJIWARA, N. & KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**. v.4, n.3, p. 281-6, 2005.

GALVÃO, A.L.B. & CARVALHO, M.B. Participação do óxido nítrico na fisiopatologia da doença renal crônica. **Semina: Ciências Agrárias**. n.35, p. 2625-2634, 2014.

GENG, J.G. Direction migration of leukocytes: their pathological roles in inflammation and strategies for development of anti-inflammatory therapies. **Cell Research**. v. 11, p. 85-88, 2001.

GHOSH, M.N. & SINGH, H. Inhibitory effect of a pyrrolizidine alkaloid, crotalaburnine, on rat paw oedema and cotton pellet granuloma. **British Journal of Pharmacology**. v. 51, n. 4, p. 503-508, 1974.

GLASS, C.K.; et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **CELL**. v. 140, n. 6, p. 918-934, 2010.

GOMEZ, I.; FOUDI, N.; LONGROIS, D. & NOREL, X. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 89, p. 55-63, 2013.

GONZÁLEZ, F.H. & SILVA, S.C. Bioquímica Clínica de Lipídios - As prostaglandinas. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 7. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 76-77.

GULLO, V.P. & HUGHES, D.E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 2, p. 281-286, 2005.

HADDAD, J.J. Molecular Regulation of Inflammatory Pain and Hyperalgesia – Is NF- κ B the Lynchpin? Focus Article and Critical Review. **Excli Journal**. v. 6, p. 68-92, 2007.

HARRIS, S.G.; et al. Prostaglandins as Modulators of Immunity. **Trends in Immunology**. v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HATA, A.N. & BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 103, p. 147– 166, 2004.

Henderson NC & Sheppard D. Integrin-mediated regulation of TGF β in fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, p. 891–896, 2013.

HILL, C.A. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. **Frontiers in Bioscience**. v. 16, p. 3233-3251, 2011.

HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, p. 103-114, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H. & OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**. v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JACQUES, F.M.B. & BERTULINO, P. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). **Plant Systematics and Evolution**. v. 274, n. 1, p. 83-97, 2008.

JUBELI, E.; MOINE, L.; VERGNAUD-GAUDUCHON, J. & BARRATT G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. **Journal of Controlled Release**. v. 158, p. 194–206, 2012.

JUTEL, M.; et al. Immune Regulation by Histamine Opinion. **Current Opinion in Immunology**. v. 14, p. 735–740, 2002.

KANAZAWA, N.; TCHERNEV, G. & WOLLINA, U. Autoimmunity versus autoinflammation-friend or foe? **Wiener Medizinische Wochenschrift**. v. 164, n.13-14, p. 274-7, 2014.

KASHUBA, E.; BAILEY, J.; ALLSUP, D. & CAWKWELL, L. The kinin–kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**. v. 18, p. 279–296, 2013.

KATO, K.; YOKOMIZO, T.; IZUMI, T. & SHIMIZU, T. Cell-specific Transcriptional Regulation of Human Leukotriene B4 Receptor Gene. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, n. 3, p. 413- 420, 2000.

KEMPEN, T.S; et al. Perception of self: distinguishing autoimmunity from autoinflammation. **Nature Review Rheumatology**. v. 11, n. 8, p. 483–492, 2015.

KENNE, E. & RENNE, T. Factor XII: a drug target for safe interference with thrombosis and inflammation. **Drug Discovery Today**. v. 19, p. 1459-64, 2014.

KIDD, B.L. & URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal Anaesthesia**. v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KINGSTON, W.P. & GREAVES, M.W. Actions of prostaglandin E2 metabolites on skin microcirculation. **Agents Actions**. v. 16, n. (1-2), p. 13–14. 1985.

KLEBANOFF, S.J. & CLARK, R.A. **The Neutrophil: Function and Clinical Disorders**. Elsevier/North-Holland Amsterdam, 1978.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal Leukocyte Biology**. v. 88, p. 1157-62, 2010.

KOPP, S. The influence of Neuropeptides, Serotonin, and Interleukin 1B on Temporomandibular Joint Pain and Inflammation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 56, p. 189-191, 1998.

KOU, J.; et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**. v. 28, n. 1, p. 176-180, 2005.

KROHN, R.I. The colorimetric detection and quantification of total protein. **Current Protocols in Cell Biology**. v. 3, p. 3H, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K. & ASTER, M.D. **Robbins Basic Pathology**. 9 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 928p.

JI, H.F.; LI, X.J. & ZHANG, H.Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Reports**. v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

LEITE, F.C.; et al. Curine, an alkaloid isolated from *Chondrodendron platyphyllum* inhibits prostaglandin E2 in experimental models of inflammation and pain. **Planta Medical**. v. 80, n. 13, p. 1072–1078, 2014.

LI, L.; HSU, A. & MOORE, P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation — a tale of three gases. **Pharmacology Therapy**. v. 123, p. 386-400, 2009.

LIMA, T.F.A.; et al. Warifteine, an Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, Inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

LOH, T.P.; LEONG, S.M. & SETHI, S.K. High concentration of IgM- paraprotein causes over-estimation of serum total protein by certain biuret method. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 59, n. 9, p. e205-7, 2013.

MACKEY, C.R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. **Nature Immunology**. v. 9, n. 9, p. 988-988, 2008.

MAKRILIA, N.; KOLLIAS, A.; MANOLOPOULOS, L. & SYRIGOS, K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. **Cancer Investigation**. v. 27, p. 1023-37, 2009.

MARINHO, A.F. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da warifteína em extrato de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Milona). 2008. 159f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

MANGUEIRA, L.F.; BRAZ, A.S.; MANGUEIRA, D.B. & DINIZ, M.F.F.M. A Ação do *Cissampelos Sympodialis* Eichl: uma Perspectiva para o Tratamento da Asma. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n. 2, p. 77-86, 2010.

MAURER, M.; et al. New topics in bradykinin research. **Allergy**. v. 66, p. 1397–1406, 2011.

McDERMOTT.; et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. **Cell**. v. 97, n. 1, p. 133–144, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**. v. 140 n. 6, p. 771-6, 2010.

MELO, O.S.; et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Lettes**. v. 142, n. (1-2), p. 143-51, 2003.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**. v. 51, p. 212-237, 1997.

MITSUI, A.; et al. Deficiency of both L-selectin and ICAM-1 exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation through increased infiltration of antigen presenting cells. **Clinical Immunology**. v. 157, p. 43–55, 2015.

MOURA, M.D.; et al. As plantas medicinais nas feiras de saúde da Paraíba. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 37, n. 2, p. 119, 2001.

MOURA, N.P. Caracterização anatômica e química de espécies de *Cissampelos* L. (Menispermaceae) utilizadas como medicinais no nordeste do Brasil. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE

MULLER, W.A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annual Review of Pathology**. v. 6, p. 323–344, 2011.

NAGATA, K.; FUJIMIYA, M.; SUGIURA, H. & UEHARA, M. Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. **The Histochemical Journal**. v. 33, n. (9-10), p. 559-68, 2001.

NAIDU, P.S.; et al. Regulation of Inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 334, n. 1, p. 182-190, 2010.

NUNES, C.R. & ABREU, A.M.O.W. Influência dos radicais livres e envolvimento do processo inflamatório na aterosclerose. **Vértices**. v. 14, p. 53-69, 2012.

PETHÖ, G. & REEH, P.W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiological Review**. v. 92, p. 1699–1775, 2012.

PETROVSKA, BB. Historical review of medicinal plants usage. **Pharmacognosy Reviews**. v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PINHEIRO, M.M.; *et al.* Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. **Journal Ethnopharmacology**. v. 146, n. 1, p. 324-30, 2013.

PIUVEZAM, M.R.; PEÇANHA, L.M.T.; ALEXANDER, J.; THOMAS, G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 67, n. 01, p. 93-101, 1999.

POBER, J.S. & SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.

RAJESH, A.; RAJESH, P.; PANKAJ & VIJAY K. A brief cause of acute inflammation: an overview. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**. v. 2, p. 31-35, 2014.

RATES, S.M.K. Plants as source drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

RENNE T.; *et al.* In vivo roles of factor XII. **Blood**. v. 120, p. 4296-303, 2012.

RHODES, D.G. A revision of the genus *Cissampelos*. **Phytologia**. v. 30, p. 415-485, 1975.

RICCIOTTI, E. & FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**. v. 31, p. 986-1000, 2011.

ROCHA, J.D.; *et al.* Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta Medica**. v. 76, n. 4, p. 325–330, 2010.

RODRIGUES, A.G. **Fitoterapia no Sistema Único de Saúde**. Anais de V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de plantas medicinais. Joinville, 2006.

RYAN, G.B. & MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **American Journal of Pathology**. v. 86, n. 1, p. 183–276, 1977.

SANTIAGO, R.F.; BRITO, T.V.; DIAS, J.M.; et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**. v. 38, n. 6, p. 2203-15, 2015.

SHAJIB, M.S. & KHAN, W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiology**. v. 213. n. 3, p. 561–574, 2015.

SHACHAR, I. & KARIN, N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. **Journal Leukocyte Biology**. v. 93, p. 51–61, 2013.

SHARMA, J.N. Basic and clinical aspects of bradykinin receptor antagonists. **Progress in Drug Research**. v. 69, p. 1-14, 2014.

SHARMA, J.N. & AL-SHERIF, G.J. The Kinin System: Present and Future Pharmacological Targets. **America Journal Biomedical Sciences**. v. 3, p. 156-169, 2011.

SHERWOOD, E.R, TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA V.G.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. *Journal of natural products*. v. 76, n. 6, p. 1071-7, 2013.

SINGH, B.M.; NERI, G.; Bhole, P. & JAIPRAKASH, M. Pain and inflammation: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 3, n. 12, p. 4697-4709, 2012.

SIMONS, F.E.R. & SIMONS, K.J. Histamine and H1-Antihistamines: Celebrating a Century of Progress. **Journal Allergy Clinical Immunology**. v. 128, p. 1139-1150, 2011.

SOUZA, E.T.; et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. **Mar Drugs**. v. 7, n. 4, p. 689–704, 2009.

SYKES, L.; MACINTYRE, D.A.; TEOH, T.G.; BENNETT, P.R. Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 148, p. 29 – 40, 2014.

TAKEUCHI, O & AKIRA, S. Pattern Recognition and Inflammation. **Cell**. v. 140, p. 805-820, 2010.

THEOHARIDES, T.C.; ALYSANDRATOS, K.D.; ANGELIDOU, A.; et al. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1822, n. 1, p. 21-33, 2012.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; AGRA, M.F.; DINIZ, M.F.F. Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of *Cissampelos sympodialis* Eichl in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leukocytes. **Phytotherapy Research**. v. 9, p. 473-477, 1995.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; DUARTE, J.C. & SOUZA, D.P. Bronchodilator activity of na aqueous fraction of na ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine**. v. 4, n. 3, p. 233-238, 1997a.

THOMAS, G.; BURNS, FS.; PYNE, N.J. Characterization on an extract from leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea, cyclic

nucleotide phosphodiesterase activity and intracellular c-AMP. **Phytotherapy Research**. v. 11, p. 496-499, 1997b.

THOMAS, G.; SELAK, M. & HENSON, P.M. Effects of the aqueous fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in human neutrophils. **Phytotherapy research**. v. 13, p. 9 -13, 1999.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H. & HOLE, J. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI, A.M.; PAPAGEORGIOU, C.T.N. & STEFANADIS, C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**. v. 10, p. 4-18, 2012.

TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**. v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T. & PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

VEIGA, V.F. & MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3 p. 464-71, 2008.

VASCONCELOS, R.M.C.; LEITE, F.C.; LEITE, J.A.; et al. Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 34, n. 6, p.1028-1038, 2012.

VIEIRA GC. Análise celular e molecular do efeito da instilação nasal do extrato das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) e seus alcaloides no processo alérgico

experimental. 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

Vieira, G.C.; De Lima, J.F.; De Figueiredo, R.C.B.Q.; et al. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+T Cells. **Phytotherapy Research**. v. 27, p. 916–925, 2012.

VINEGAR, R; SCHREIBER, W. & HUGO, R. Biphasic Development of carrageenin edema in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 166 p. 96–103, 1969.

WAI-WONG, C.; DYE, D.E. & COOMBE, D.R. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. **International Journal of Cell Biology**. v. 2012, p. 340296, 2012.

WILSON, A.M.; O'BYRNE, P.M.; PARAMESWARAN, K. Leukotriene Receptor Antagonists for Allergic Rhinitis: A Systematic Review and Meta-analysis. **The American Journal of Medicine**. v. 116, p. 338-344, 2004.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, F.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P. & HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. **Biology of Disease**. v. 80, p. 617-653, 2000.

WILHELM, D.L. Mechanism responsible for increased vascular permeability in acute inflammation. **Agents and Actions**. v. 3, n. 5, p. 297-306, 1973.

WILLIAMS, T.J. & MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability inflammation. **Nature**. v. 246, p. 215-217, 1973.

WINK, D.A.; HINES, H.B.; CHENG, R.Y.S.; SWITZER, C.H.; et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal Leukocyte Biology**. v. 89, p. 873-91, 2011.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, ŁA. & SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflammation**. v. 2014, p. 561459, 2014.

WRIGHT, D.B.; MEURS, H. & DEKKERS, B.G.J. Integrins: therapeutic targets in airway hyperresponsiveness and remodelling? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 35, p. 567–574, 2014.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals Internal Medicine**. v. 140, n. 6, p. 441–451, 2004.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C. & CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 20, p. 100-106, 2013.

YOKOMIZO, T. Leukotriene B4 receptors: Novel roles in immunological regulations. **Advances in Enzyme Regulation**. v. 51, p. 59–64, 2011.

YOKOMIZO, T. Recent Progress in Lipid Mediators Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2. **The Journal of biochemistry**. v. 57, n. 2, p. 65–71, 2014.

YUAN, S.Y.; SHEN, Q.; RIGOR, R.R. & WU, M.H. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvascular Research**. v. 83, n. 1, p. 82-88, 2012.

Anexo



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Efeito da Milonina, alcaloide de *Cissampelos sympodialis* eichl. (Menispermaceae), em modelos experimentais de inflamação aguda**”, protocolo nº **003/2016** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Márcia Regina Piuvezam** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2017
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> - Swiss
Número de animais	220 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 25-30g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Professor Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da CEUA-UFPB