



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**



PgPNSB

FAGNER CARVALHO LEITE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
ALCALOIDE CURINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E
NOCICEPÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS**

João Pessoa – PB

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

FAGNER CARVALHO LEITE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
ALCALOIDE CURINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E
NOCICEPÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, área de concentração - Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

João Pessoa - PB

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS



PgPNSB

Fagner Carvalho Leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, área de concentração - Farmacologia.

Dissertação de Mestrado avaliada em 27 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Orientadora

Profa. Dra. Janeusa Trindade de Souto
Professora Adjunta IV - Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)
Examinadora Externa

Profa. Dra. Mariana Sobral Castelo Branco
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Examinador/a Interno/a

Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais, **Francisco de Assis Carvalho e Maria do Desterro de Jesus Carvalho**, pelo amor, educação, apoio e incentivo aos meus estudos.

Aos meus irmãos, **Maria Aparecida de Carvalho e José Fabiano Carvalho** que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por permitir que este sonho pudesse se concretizar e pelas oportunidades que sempre coloca em meu caminho.

Gostaria de agradecer a minha família, meus pais **Francisco de Assis Carvalho** e **Maria do Desterro de Jesus Carvalho**, meus irmãos **Maria Aparecida** e **José Fabiano Carvalho**. Eu não teria chegado tão longe se não tivesse o seu constante apoio e incentivo. Vocês nunca me deixaram desistir dos meus sonhos. Obrigado por acreditarem em mim.

A minha namorada **Paula Regina Rodrigues Salgado**, pelo apoio solidário e amoroso, amor, incentivo e compreensão, essenciais para a realização deste trabalho. Obrigado por sempre acreditar em mim. Obrigado por sempre me incentivar a continuar trabalhando em busca dos meus sonhos. Eu não poderia ter feito isto sem você.

À professora **Márcia Regina Piuvezam**, exemplo de orientadora, cujo caráter, profissionalismo e humildade sempre me servirão como referência. Muito obrigado por ter confiado a mim a execução deste trabalho, por acreditar em meu potencial e por ensinar-me diariamente valores que sempre levarei comigo. Minha admiração pela senhora é eterna.

A Profa. Dra. **Celidarque da Silva Dias** por ter gentilmente cedido a substância teste.

Aos doutorandos, **Jaime Ribeiro Filho** e **Hermann Ferreira Costa**, pela orientação, paciência, e dedicação na realização dos experimentos, amizade e bom humor.

A Professora **Giciane Carvalho Vieira**, pelos valiosos conselhos, fundamentais para a realização deste trabalho e por sua amizade, essencial para o meu crescimento profissional e pessoal.

A minha grande amiga e mestranda, **Renata Costa**, pelo apoio e ajuda constante, por todos os incentivos e conselhos, mas principalmente por sua amizade, que tornou esta jornada mais leve. Muito obrigado.

A **Juliana da Silva Brandi**, pela ajuda constante, pelos laço de amizade que foram criados e por todos os momentos vividos. Muito obrigado.

A minha aluna de iniciação científica, **Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**, pela imensa contribuição na execução deste trabalho, sempre com disposição e muita responsabilidade.

A **Anne Kaliery** por sua amizade sincera, bom humor, sempre disposta a me ajudar nas horas que tanto precisei.

Ao colega e amigo **Adriano Francisco Alves**, estudante de iniciação científica do laboratório de imunofarmacologia, pela disposição em ajudar na realização dos experimentos e por sempre estar presente, até mesmo nos cansativos finais de semana, muito obrigado.

A minha colega de mestrado e laboratório, **Jacqueline Alves Leite**, por toda ajuda prestada. Muito obrigado.

As minhas amigas de graduação e mestrado, **Hellane Fabrícia** e **Juliana da Nobrega**, pela amizade e companheirismo durante essa fase da minha vida.

Ao mestrando do laboratório de psicofarmacologia, **Diogo Vilar** pela inestimável ajuda na realização dos experimentos de nocicepção.

Aos Doutorandos, **Fábio Henrique Tenório** e **João Carlos Pita**, pela fundamental contribuição na realização do mestrado.

A **Talissa Mozzini** obrigado por mostrar coragem de continuar em frente sem se importar com a barreiras que encontramos.

Aos colegas de mestrado, **Abrahão, Ítalo, Gregório, Felipe, Viviane, Juliana...**

Aos alunos de iniciação científica **Laís, Raquel, Talita, Vitor, Jucélio e Guilherme**, pela fundamental contribuição em manter a convivência no laboratório sempre agradável.

Aos meus amigos de graduação **Guilherme Eduardo Nunes Dias** (Guidu), **Sebastião Monteiro Neto** (Netinho) e **Vicente de Oliveira Neto** (Netão), pelo convívio sempre agradável, pela consideração e torcida de sempre. Muito obrigado pela amizade sincera.

À **coordenação** do Curso de **Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** e aos **professores** pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos funcionários do Biotério Prof. Thomas George, em especial **José Crispim Duarte**, pela paciência, atenção e cuidado com os animais.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a consolidação deste trabalho o meu muito obrigado.

*O conhecimento torna a alma jovem e diminui a
amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Os alcaloides representam a maior classe de metabólitos secundários derivados de plantas e possuem uma série de atividades farmacológicas, tais como: eméticos, anticolinérgicos, antitumoral, diurético, simpaticomiméticas, antiviral, anti-hipertensivos, analgésicos, antidepressivos, mio-relaxante, antitussígenos, antimicrobiana e anti-inflamatória. A Curina é o principal alcaloide bisbenzilisoquinolinico isolado da planta *Chondodendron platyphyllum* (Menispermaceae) e apresentou efeitos imunomoduladores em modelos experimentais de inflamação alérgica. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar as atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da curina. Para tal foram utilizados diferentes modelos experimentais de inflamação aguda e nocicepção tais como: formação de edema de pata induzido por carragenina, zimosan, lipopolissacarídeo (LPS), prostaglandina E₂ (PGE₂) e bradicinina, permeabilidade vascular induzida por ácido acético, produção de NO por células da linhagem J774.A1, migração de células e produção de citocinas/quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e KC) no modelo de pleurisia induzida por LPS em camundongos, contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e hiperalgesia induzida por LPS. Os resultados demonstraram que a curina foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05-0,001$) a formação do edema de pata induzido por carragenina, zimosan, LPS e PGE₂, porém não foi capaz de reduzir o edema induzido pela bradicinina, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o extravasamento de líquido para o peritônio induzido por ácido acético, reduziu a produção de NO *in vitro*, ademais diminuiu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural e reduziu os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1 e KC. No teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, a curina mostrou-se eficácia significativa ($p < 0,05$), aumentando a latência e diminuindo o número das contorções abdominais. Em ambas as fases do teste da formalina, a curina foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05-0,001$) o tempo de lambida da pata dos animais, além de aumentar a latência para percepção do estímulo térmico no teste de placa quente na hiperalgesia induzida por LPS. Portanto, este trabalho demonstrou que a curina possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva por inibir a ação de células e moléculas essenciais para o início da inflamação e indução da dor inflamatória.

Palavras-chave: inflamação, anti-inflamatório, nocicepção, produtos naturais, curina, LPS.

ABSTRACT

The alkaloids represent the largest single class of secondary metabolites of plants and they have a range of pharmacological activity, such as: emetic, anti-cholinergic, antitumor, diuretic, sympatho-mimetic, antiviral, antihypertensive, analgesic, antidepressant, mio-relaxant, anti-tussigen, antimicrobial and anti-inflammatory activities. Curine is a major bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Chondodendron platyphyllum* (Menispermaceae). This alkaloid presented immunomodulatory effects in experimental model of allergic inflammation. In order to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of curine different experimental models of acute inflammation and experimental models of pain sensitivity (*nociception*) were used: paw edema formation induced by carrageenan, zymosan, LPS, prostaglandin E₂ (PGE₂) and bradykinin, vascular permeability induced by acetic acid, NO production by J774.A1 cells, cell migration and cytokines/chemokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 and KC) production in a mice model of LPS-induced pleurisy, abdominal writhing, formalin test and LPS-Induced hyperalgesia. The results showed that curine significantly reduced ($p < 0,05-0,001$) the paw edema evoked by carrageenan, zymosan, LPS and prostaglandin E₂. However, without any influence on the bradykinin induced edema, reduced the increase in vascular permeability induced by acetic acid, inhibits LPS/IFN γ -induced NO production in J774.A1 cells, reduced neutrophil recruitment and attenuated levels of TNF- α , IL-6, MCP-1 e KC into the pleural cavity. In abdominal writhing induced by acetic acid, curine was significantly effective ($p < 0,05$), increasing the latency to first writhing and decreasing the number of writhings. In both phases of formalin test, curine was able to significantly reduced ($p < 0,05-0,001$) time to paw licking, besides increasing the latency to thermal stimuli perception in LPS-induced hyperalgesia in the hot-plate test. Therefore, this study demonstrated that curine has anti-inflammatory and antinociceptive activities by inhibiting the action of both cells and molecules involved in inflammatory process and inflammatory pain.

Keywords: Inflammation, anti-inflammatory, nociception, natural products, curine, LPS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
Ac. acético	Ácido acético
ANOVA	Análise de variância
BK	Bradicinina
Ca⁺²	Íons cálcio
COX	Ciclooxigenases
cPGES	Prostaglandina E sintetase citosólica
Dexa	Dexametasona
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Proteína quinase regulada por estímulos extracelular
G-CSF	fator estimulante de colônias de granulócitos
H1	Receptor de histamina tipo 1
H2	Receptor de histamina tipo 2
H3	Receptor de histamina tipo 3
H4	Receptor de histamina tipo 4
HMGB-1	Grupo de alta motilidade
HSP	Proteína do choque térmico
i.p	Intraperitoneal
i.pl	Intrapleural
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon γ
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1β, 6, 8, 17	Interleucina 1 β , 6, 8, 17
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KC/CXCL1	Quimiocina derivada de queratinócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MIP	Proteína Inibitória de Macrófagos
mPGES	Prostaglandina E sintetase associada a membrana
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato de sódio
PGE2	Prostaglandina E 2

PGES	Prostaglandina E sintetase
PGs	Prostaglandinas
RANTES	Citocina regulada sob ativação que é expressa e secretada por células T normais
ROS	Reativos do oxigênio
s.c	Subcutânea
TLR	Receptor semelhante ao TOLL
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide 1
TTX-r	Canais de sódio dependentes de voltagem resistentes a tetrodotoxina
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinais clínicos da inflamação, descritos por Celsus há mais de 2000 anos: vermelhidão, calor, inchaço, dor e perda da função.....	17
Figura 2- Cascata de adesão dos leucócitos.....	20
Figura 3- Componentes do processo inflamatório.....	24
Figura 4 - A) Fotografia das folhas e caule de <i>C. Platyphyllum</i> e Alcaloides Bisbenzilisoquinolínicos de <i>C. platyphyllum</i> . B)curina; C)isocurina;D) O-metil-curina.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido pela carragenina.....60
- Gráfico 2- Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido pelo zimosan.....61
- Gráfico 3: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por LPS.....63
- Gráfico 4: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por PGE2.....65
- Gráfico 5: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por Bradicinina.....67
- Gráfico 6. Efeito da curina na produção de nitrito por células da linhagem J774 A.1.....69
- Gráfico 7: Efeito do tratamento oral com a curina sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético.....70
- Gráfico 8. Efeito da curina sobre a migração de células para a cavidade pleural induzida por LPS.....72
- Gráfico 9. Efeito do tratamento com curina nos níveis das citocinas TNF- α , IL1- β e IL-6 no lavado pleural em modelo de pleurisia induzida por LPS.....74
- Gráfico 10. Efeito do tratamento com curina nos níveis das citocinas MCP-1 e KC/CXCL1 no lavado pleural em modelo de pleurisia induzida por LPS.....75
- Gráfico 11. Efeito do tratamento com curina sobre a latência e numero de contorções abdominais induzidos por ácido acético.....76
- Gráfico 12. Efeito do tratamento com curina sobre os estímulos dolorosos induzidos pela formalina.....78
- Gráfico 13. Efeito da curina na hiperalgesia induzida por LPS.....79

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIII
SUMÁRIO.....	XIV
1.0 INTRODUÇÃO	17
1.1 INFLAMAÇÃO	17
1.2 CÉLULAS DA INFLAMAÇÃO AGUDA	21
1.2.1 <i>Neutrófilos</i>	21
1.2.2 <i>Monócitos e Macrófagos</i>	22
1.3.1 <i>Aminas vasoativas</i>	25
1.3.2 <i>Citocinas e quimiocinas</i>	26
1.3.3 <i>Prostaglandina E2 (PGE₂)</i>	30
1.3.4 <i>Bradicinina</i>	31
1.3.5 <i>Óxido Nítrico (NO)</i>	33
1.3.6 <i>Moléculas de Adesão</i>	34
1.4 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	37
1.4.1 <i>Chondodendron platyphyllum (A.St.Hil) (Menispermaceae) e o alcaloide curina</i>	40
2.0 OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVO GERAL	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 OBTENÇÃO DA CURINA.....	46
3.2 PREPARO DA CURINA	46
3.3 ANIMAIS.....	47
3.4 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	47
3.5 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DIVERSOS AGENTES FLOGÍSTICOS.....	48

3.6 CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM CONTÍNUA.....	49
3.7 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (CC50).....	49
3.8 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS.....	50
3.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	51
3.10 PLEURISIA INDUZIDA POR LPS	52
3.10.1 Contagem total e diferencial de leucócitos do lavado pleural	53
3.10.2 Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	53
3.11 TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	54
3.12 TESTE DA FORMALINA.....	55
3.13 HIPERALGESIA INDUZIDA POR LPS.....	55
4.0 RESULTADOS	58
4.1 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	58
4.2 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ZIMOSAN	60
4.3 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	61
4.4 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR PROSTAGLANDINA E ₂ (PGE ₂).....	63
4.5 EFEITO DA CURINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA.....	65
4.6 EFEITO DA CURINA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CÉLULAS J774 A.1.....	67
4.7 EFEITO DA CURINA NA PERMEABILIDADE VASCULAR INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	69
4.8 EFEITO DA CURINA NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE PLEURAL INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	70
4.9 EFEITO DA CURINA NOS NÍVEIS DE CITOCINAS TNF-A, IL-1B E IL-6 NO LAVADO PLEURAL	72
4.10 EFEITO DA CURINA SOBRE OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS MCP-1 E KC/CXCL1 DO LAVADO PLEURAL	74
4.11 EFEITO DA CURINA NAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO.....	75
4.12 EFEITO DA CURINA NA ATIVIDADE NOCICEPTIVA INDUZIDA PELA FORMALINA.....	76
4.13 EFEITO DA CURINA NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR LPS	78
5.0 DISCUSSÃO	80
6.0 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

INTRODUÇÃO

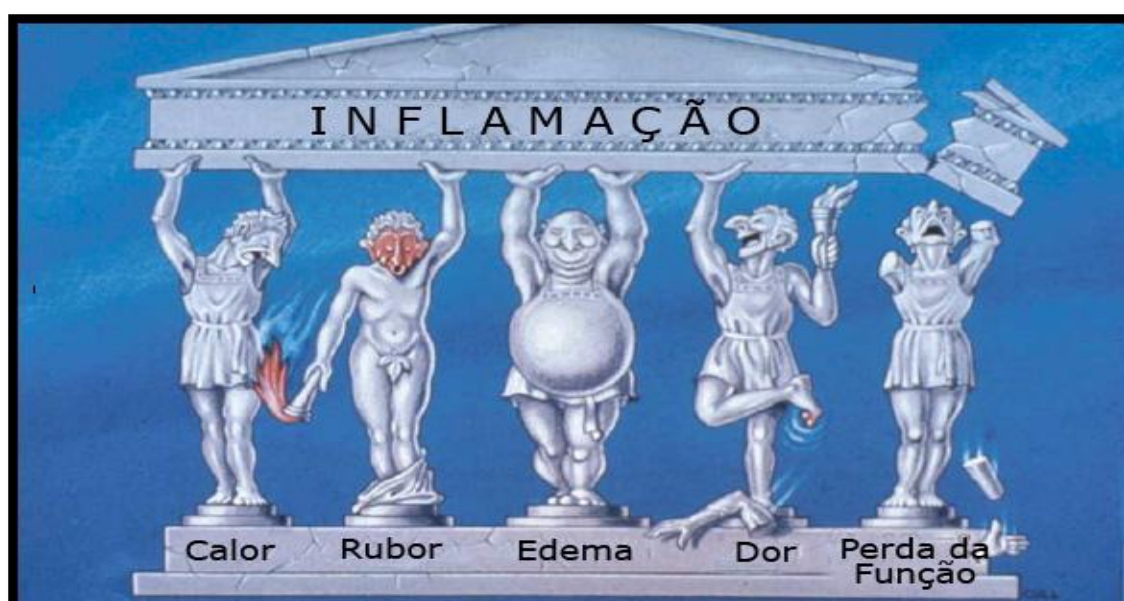
1.0 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta benéfica do hospedeiro contra um corpo estranho ou lesão tecidual que leva, em última análise a restauração das estruturas e funções dos tecidos. O primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação foi o médico romano Celsus Cornelius no século 1. Estes sintomas vieram a ser conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor (vermelhidão e inchaço, com calor e dor) (MAJNO, 1975; MEDZHITOV, 2010).

A base fisiológica dos quatro sinais cardinais da inflamação foi evidenciada por Augustus Waller e Cohnheim Julius no século dezenove, que demonstraram a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido inflamado e outras alterações vasculares são características de uma resposta inflamatória aguda. Analisando os tecidos vivos sob o microscópio, Cohnheim observou vasodilatação, extravasamento de plasma, e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido circundante (MAJNO e JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2010). O quinto sinal cardinal, perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858, em seu livro *Cellular Pathologie* (MAJNO, 1975; MEDZHITOV, 2010).

Figura 1 - Sinais clínicos da inflamação, descritos por Celsus há mais de 2000 anos: vermelhidão, calor, inchaço, dor e perda da função.



Fonte: (adaptado de LAWRENCE *et al.*, 2002)

O processo inflamatório é dividido em padrões agudos e crônicos. A inflamação aguda possui duração relativamente curta - minutos, horas ou alguns dias, e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido (plasma) rico em proteínas e migração de células (principalmente neutrófilos) para o local da lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A inflamação crônica é de maior duração e está associada histologicamente à presença de linfócitose e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

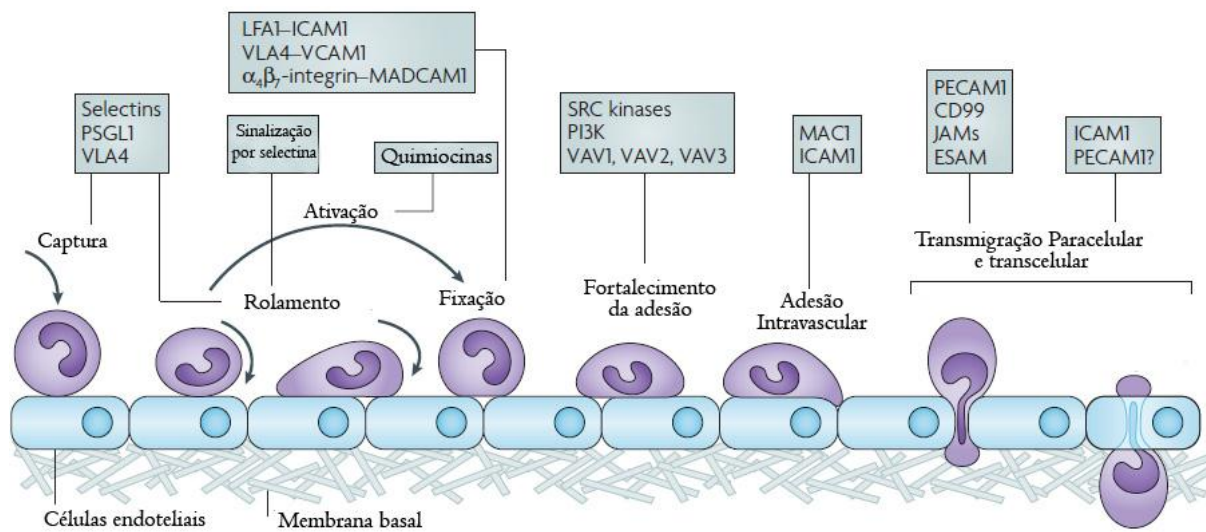
A inflamação aguda tem um papel fisiológico importante na defesa do hospedeiro e reparação dos tecidos, mas quando esse processo é exacerbado pode levar à lesão tecidual excessiva e evoluir para um processo crônico, podendo ocasionar câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas. Para que isso não ocorra, é necessário limitar o processo inflamatório pela eliminação do infiltrado celular e de seus produtos potencialmente tóxicos (BALKWILL e COUSSENS, 2004; AGGARWAL *et al.*, 2006). Uma grande variedade de eventos, incluindo danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação e injúria tecidual, podem induzir a inflamação aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Na injúria tecidual por microrganismo o ambiente inflamatório pode ser decorrente do efeito direto exercido pelo agente patológico, ou por outro lado, ser consequência do influxo de leucócitos no tecido (HE *et al.*, 2007). À medida que os agentes patológicos são depositados nos tecidos do hospedeiro, neutrófilos e/ou monócitos circulantes podem ser recrutados do compartimento intravascular para o sítio onde se encontram tais agentes (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

O processo inflamatório agudo é iniciado a partir da ativação de células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos) (SIMON e GREEN, 2005; SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Células fagocíticas incluindo macrófagos teciduais, neutrófilos e monócitos circulantes apresentam papel-chave na resposta inflamatória aguda (SIMON e GREEN, 2005). Estas células respondem a sinais (sinais de perigo) gerados no local da infecção tais como, o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), a Interleucina-1 (IL-1 β), prostaglandinas (PGs), cininas e componentes intracelulares, como o ATP (trifosfato

de adenosina) (SALLUSTO *et al.*, 1995; SCHNURR *et al.*, 2000), peptídeos contendo N-formil-metionina liberados por bactérias, proteínas do sistema de coagulação, produtos do complemento, e outras citocinas, tais como interferon- γ , IL-6, IL-12 e IL-17 liberadas dos macrófagos tissulares. Além destes, é importante reconhecer o papel das HSP (*heat shock protein* – proteína do choque térmico), HMGB-1 (*high mobility group box1* – grupo de alta motilidade) e do ácido úrico como sinais de perigo gerados tanto no trauma como na inflamação pulmonar (FLOHE *et al.*, 2008; GASSE *et al.*, 2009). Conceitualmente, os sinais de perigo são moléculas ou estruturas moleculares liberadas ou produzidas por células sob estresse e que são reconhecidas por células, resultando no desencadeamento da resposta imune (MATZINGER, 1994; GALLUCCI e MATZINGER, 2001). O TNF- α e IL-1 β estimulam células endoteliais próximas do local da inflamação que passam a expressar moléculas de adesão tais como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e selectinas que ligam a componentes da superfície das células fagocitárias provocando a aderência dos fagócitos ao endotélio (MAY *et al.*, 1996; MCHALE *et al.*, 1999; NAVARRO-GONZALEZ *et al.*, 2011). Vasodilatadores produzidos no local da inflamação provocam o afrouxamento das junções entre as células endoteliais e os fagócitos então atravessam a barreira endotelial “espremendo-se” entre as células endoteliais via um processo chamado de diapedese ou transmigração (figura. 2). Uma vez formado espaços no tecido, quimiocinas atraem fagócitos ao local inflamado por quimiotaxia (movimento em direção a um gradiente químico) (LEY *et al.*, 2007).

Os mediadores liberados atuam localmente corroborando com o aparecimento dos sinais cardinais característicos desse processo, ou seja, dor, calor, rubor e tumor, acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1994).

Figura 2- Cascata de adesão dos leucócitos.

Os três originais passos são: Rolamento, o qual é mediado por selectinas, ativação, a qual é mediada por quimiocinas, e a fixação, mediada por integrinas. Progressos têm sido produzidos na definição de passos adicionais: captura, fortalecimento da adesão e transmigração paracelular e transcelular. (Fonte: Adaptado de Ley et al, 2007).

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as consequências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais cardinais localmente. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticoides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda e nessas situações pode-se observar que o sistema nervoso central e imune estão funcionalmente conectados e integrados (STADNYK e GAULDIE, 1991).

1.2 CÉLULAS DA INFLAMAÇÃO AGUDA

1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos, juntamente com os eosinófilos e basófilos, pertencem a um grupo de leucócitos designados como granulócitos, uma vez que contêm grânulos intracelulares. Os neutrófilos são também chamados de polimorfonucleares (PMN), devido ao seu núcleo segmentado que é dividido em vários lóbulos (PORTH, 2010).

O tráfico dos neutrófilos maduros da medula óssea é regulado pelo fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) que apresenta função também de reduzir a apoptose desta célula no sítio inflamado (SEMERAD *et al.*, 2002; GREGORY *et al.*, 2007). Os neutrófilos constituem cerca de 50-70% dos leucócitos no sangue periférico e circulam por cerca de 10 horas depois morrem. Eles patrulham os vasos sanguíneos e nos sinais inflamatórios, deixarão de circular e migrarão para os tecidos inflamados (PORTH, 2010). A vida útil dos neutrófilos durante a inflamação é reforçada devido à expressão de sinais de sobrevivência (ALTZNAUER *et al.*, 2004). No entanto, após cerca de três dias, os neutrófilos sofrem apoptose e são removidos do sítio inflamado por macrófagos (LAUBER *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2006; PORTH, 2010). A depuração das células apoptóticas por fagocitose é um pré-requisito para a resolução da inflamação. O pus, que é formado durante algumas infecções bacterianas, é composto principalmente de neutrófilos e restos de neutrófilos (PORTH, 2010).

Em adição, os neutrófilos são as primeiras células a extravasarem em sítios inflamatórios, sendo importante para que ocorra a eliminação dos patógenos. Durante a infecção dos tecidos, são recrutados do sangue e também mobilizados da medula óssea, o que resulta em neutrofilia sanguínea e um fornecimento adequado destas células para os tecidos. Uma vez ativados, fagocitam o antígeno estranho e exercem suas ações bactericidas por meio da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e liberação de componentes tóxicos dos grânulos (NATHAN, 2006; PUELLMANN *et al.*, 2006). A interação com o antígeno-alvo pode ser mediada por resíduos de açúcar que se ligam à lectinas na superfície bacteriana ou por receptores que se ligam às partículas opsonizadas. O fenômeno de opsonização pode ser mediado por anticorpos, geralmente imunoglobulina G (IgG), ou

componentes do sistema complemento, geralmente C3b, C4b e C3bi, que ligam-se aos receptores Fc (FcR) e aos receptores do complemento (CR), respectivamente (OFEK e SHARON, 1988; STRZELECKA *et al.*, 1997).

Em contraste, a permanência e o número excessivo de neutrófilos nos tecidos exacerbam a inflamação, liberando proteases, ROS e mediadores pró-inflamatórios (SAVILL *et al.*, 1989; SOUSA *et al.*, 2010). O acúmulo de neutrófilos nos tecidos é uma característica de condições inflamatórias agudas, mas também de várias condições inflamatórias crônicas, tais como glomerulonefrite, doença inflamatória intestinal, vasculite autoimune, dermatite e artrite reumatóide (WEISSMANN e KORCHAK, 1984; KASAMA *et al.*, 2005; RANDIS *et al.*, 2008; LARSEN *et al.*, 2009). Modelos experimentais de inflamação induzida por antígeno reproduzem algumas das características de doenças inflamatórias aguda, por aumentar o influxo dos neutrófilos (TRENTHAM *et al.*, 1977; BACON e OPPENHEIM, 1998; CANETTI *et al.*, 2001). Portanto, a redução do número de neutrófilos representa um benefício no controle de doenças inflamatórias (NATHAN, 2006; MCDONALD *et al.*, 2010).

1.2.2 Monócitos e Macrófagos

Os monócitos compreendem 5-10% dos leucócitos periféricos circulantes. Estas células se desenvolvem na medula óssea, circulam no sangue periférico e migram para o tecido inflamado (VAN FURTH, 1985; PORTH, 2010). Durante o extravasamento para os tecidos os monócitos se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, por isso, estas células são comumente denominadas derivadas de monócitos (KUMAR e JACK, 2006; GEISSMANN *et al.*, 2010). Os macrófagos são constitutivamente recrutados do sangue circulante na forma de monócitos. A diferenciação dos monócitos em macrófagos é influenciada por eventos de adesão durante o extravasamento e pelo meio inflamatório local (WESLEY *et al.*, 1998; CHOMARAT *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001; SUDHAKARAN *et al.*, 2007). Em comparação com a cinética de aparecimento dos neutrófilos no sítio inflamado, os macrófagos têm um início mais lento de aparecimento durante os estágios iniciais da inflamação (DALE *et al.*, 2008).

Os macrófagos são células residentes dos tecidos, parte da rede do estroma em associação com o endotélio e epitélio. Eles são rapidamente ativados em caso de lesão tecidual ou na presença de microrganismos fornecem sinais de ativação para o endotélio (MEDZHITOV, 2010; MORI *et al.*, 2011). No processo inflamatório, os macrófagos possuem três funções principais; apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, desempenhando um papel fundamental na iniciação, resolução, e manutenção do processo inflamatório (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Os sinais de ativação para estas células incluem citocinas tais como TNF- α , IFN- γ , IL-12, fator estimulante colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), componentes bacterianos (lipopolissacarídeo (LPS)), proteínas da matriz extracelular, e outros mediadores químicos (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Após a estimulação, os macrófagos produzem várias citocinas (IL-1 β e TNF- α , IL-6) e quimiocinas (KC, IL-8, MCP-1, RANTES), e por serem as principais células produtoras de TNF- α e IL-1, desempenham um papel fundamental na iniciação da inflamação (FEGHALI e WRIGHT, 1997; CASTELLHEIM *et al.*, 2009; MEDZHITOV, 2010).

De forma semelhante aos neutrófilos, os macrófagos participam na fagocitose e na explosão oxidativa (DALE *et al.*, 2008). A fagocitose dos macrófagos induz a eliminação de células apoptóticas e microrganismos e apresentam peptídeos antigênicos às células T. Por isso, os macrófagos estão envolvidos na homeostase tecidual, bem como na imunidade (MEDZHITOV, 2008; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

Os Macrófagos também expressam receptores de limpeza (*scavenger*) que ligam a ligantes polianiônicos mediando à limpeza (*clearance*) de células apoptóticas e restos celulares (FADOK *et al.*, 1998). Além disso, os macrófagos expressam receptores do tipo toll (TLR) que estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e sinalizam a presença de vírus e bactérias (FEGHALI e WRIGHT, 1997; MEDZHITOV, 2010; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

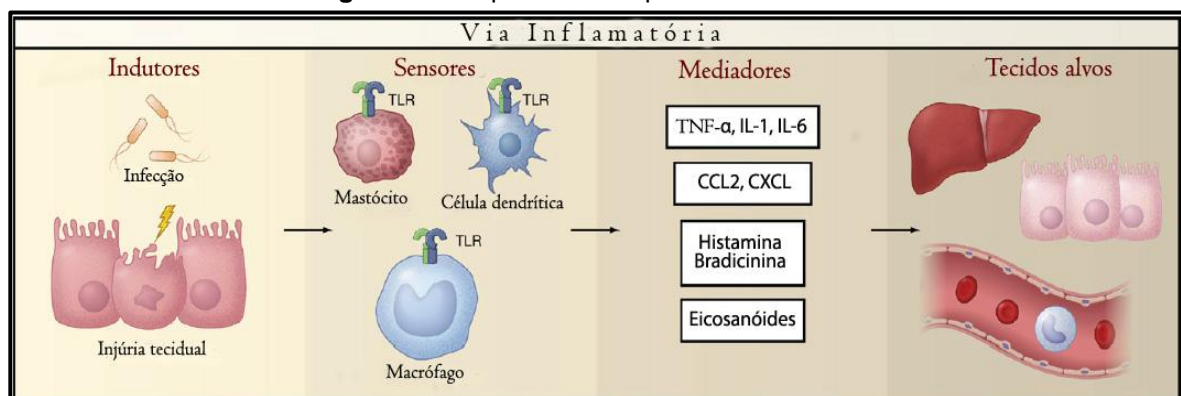
Devido à produção de uma grande variedade de mediadores e de participarem de processos homeostáticos, os macrófagos podem, em diversos casos, apresentarem sinais prejudiciais ao organismo no desenvolvimento do

processo inflamatório. Desta forma intervenções terapêuticas que agem direta ou indiretamente nessas células e em seus produtos podem abrir novos caminhos para o controle de doenças inflamatórias (RODERO e KHOSROTEHRANI, 2010).

1.3 MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO

A típica resposta inflamatória consiste em quatro componentes: os indutores inflamatórios, os sensores (receptores), os mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores, e os tecidos alvos que são afetados pelos mediadores inflamatórios (Fig. 3). Cada componente se apresenta em múltiplas formas e suas funções em diferentes combinações de vias inflamatórias (MEDZHITOV, 2010).

Figura 3- Componentes do processo inflamatório



A via inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores e os tecidos-alvo. Indutores iniciam a resposta inflamatória e são detectados por sensores. Sensores, tais como receptores Toll-like (TLRs), são expressos em células sentinelas especializados, tais como macrófagos residentes, células dendríticas e mastócitos. Eles induzem a produção de mediadores, incluindo aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas, eicosanóides, e cininas, como a bradicinina. Esses mediadores inflamatórios agem em vários tecidos-alvo para provocar mudanças em seus estados funcionais que otimizam a adaptação à condição nocivos (por exemplo, infecção ou lesão tecidual) (Fonte: adaptado de MEDZHITOV, 2010).

Uma variedade de mediadores de diferentes fontes, tais como leucócitos, plaquetas, do metabolismo do ácido araquidônico como PGs e leucotrienos, das cascatas da coagulação e do sistema complemento, são reconhecidos por exercerem papéis importantes no processo inflamatório. Esses mediadores podem ser considerados de ação rápida, como as aminas vasoativas (histamina e serotonina) e cininas, ou de ação prolongada, como as citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (ALLER *et al.*, 2006; GONZALEZ-REY *et al.*, 2007).

1.3.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas são substâncias que contêm grupamentos amino em sua estrutura, como a histamina e serotonina, que agem sobre os vasos sanguíneos para alterar a sua permeabilidade ou para causar vasodilatação (SHEPRO e DUNHAM, 1986; COTRAN *et al.*, 1996; BRAND *et al.*, 2002).

A histamina é uma diamina produzida pela descarboxilação do aminoácido histidina no aparelho de Golgi dos mastócitos e basófilos sendo responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo reações alérgicas e inflamatórias (fase inicial), secreção do ácido gástrico, neurotransmissão, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de desempenhar um papel central na hipersensibilidade tipo 1 (CHURCH, 2009). Este mediador químico é encontrado na maioria dos tecidos do organismo, porém está presente em elevadas concentrações no pulmão, na pele e no trato gastrointestinal (CHURCH, 2009).

Os efeitos da histamina são mediados por receptores do tipo H1, H2, H3, H4 que são acoplados à proteína G. Os Receptores H1 e H2 são responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina (CHURCH, 2009). Os fenômenos fisiológicos exercidos pelos receptores H1 e H2 são vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento da frequência e contração cardíaca e aumento da secreção glandular. O aumento da permeabilidade vascular leva à urticária e angioedema que são os sintomas clínicos mais comuns na anafilaxia e são vistos em 88% dos casos (OGAWA e GRANT, 2007). Embora o fator ativador de plaquetas (PAF) e metabólitos do ácido araquidônico também contribuem para a formação de urticária e angioedema (OGAWA e GRANT, 2007).

A histamina é liberada dos mastócitos por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas, quando os componentes do complemento C3a e C5a interagem com receptores de membrana específicos ou quando o antígeno interage com moléculas de IgE fixadas a células; ou ainda, por meio de outros estímulos, como substância P, poliaminas citocinas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004;

CHURCH, 2009). Além disso, a histamina promove a liberação de substância P, metabólitos do ácido araquidônico e citocinas (CHURCH, 2009).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um dos principais neurotransmissores no cérebro e também está envolvida em uma gama de ações periféricas. Pode ser encontrada no sangue e em altas concentrações nas plaquetas, que a acumulam a partir do plasma por meio de um sistema de transporte ativo, liberando-a quando sofrem agregação em locais de lesão tecidual. Funciona como mediador inflamatório e está envolvida na sensibilização de nociceptores, regulação do sono, temperatura e pressão arterial. (GONZALEZ-REY *et al.*, 2007).

1.3.2 Citocinas e quimiocinas

O tipo de precursor celular induzido depende da natureza do gatilho inflamatório. Assim, patógenos bacterianos são detectados por receptores celulares do sistema imunológico inato, como os TLRs, que são expressos em macrófagos residentes e induzem a produção de citocinas inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) e quimiocinas (por exemplo, MCP-1, CXCL1 e CXCL8), bem como PGs (TOGBE *et al.*, 2006; MEDZHITOV, 2010).

Entre as citocinas mais conhecidas, TNF- α , IL-1 β e IL-6 são vistas como de suma importância, devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas respostas inflamatórias assim como no choque séptico (EL ALWANI *et al.*, 2006; MORI *et al.*, 2011; SAADANE *et al.*, 2011). O TNF- α e a IL-1 β são secretados em grandes quantidades principalmente pelos macrófagos e aparecem na circulação em uma hora. Estas citocinas apresentam efeitos locais e sistêmicos. Acredita-se que o TNF- α , anteriormente conhecido como caquetina, seja o responsável pela caquexia ou emagrecimento observado em doenças inflamatórias crônicas e câncer (WAGNER e ROTH, 2000; EL ALWANI *et al.*, 2006).

O TNF- α pertence à superfamília TNF, que possui mais de dezenove ligantes. É produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzido por outras células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, células NK, e mastócitos) ou não inflamatórias (células endoteliais), em resposta a muitos estímulos

extracelulares como outras citocinas, proteína do choque térmico (HSP), isquemia/reperfusão, luz UV e infecções microbianas. A ação destes estímulos é transmitida intracelularmente por meio dos membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fator nuclear-kB (NF-kB) e p38 que levam à síntese de TNF- α , dentre outras citocinas (EL ALWANI *et al.*, 2006). O TNF- α exerce potente efeito inflamatório: induz a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (ZHANG *et al.*, 2002; CUZZOCREA, 2005; EL ALWANI *et al.*, 2006; TSOYI *et al.*, 2010); ativa neutrófilos e fagócitos mononucleares; induz a produção do fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; MAMBOLE *et al.*, 2010); aumenta a permeabilidade vascular; promove a liberação do NF-kB no citosol, ao estimular a degradação da subunidade inibitória I κ B. O NF-kB regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , INF- γ , as ciclooxigenases (EL ALWANI *et al.*, 2006; SUN, 2011; ZHENG *et al.*, 2011). A liberação sistêmica de TNF- α pode, entretanto, precipitar uma cascata destrutiva de eventos que resulta em lesão tecidual, disfunção orgânica e, potencialmente, morte. Entre seus efeitos sistêmicos está a indução de febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação, supressão miocárdica, indução de vasodilatadores sistêmicos com consequente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Assim como o TNF- α , a IL-1 β é um potente mediador da inflamação e da febre (WAGNER e ROTH, 2000). Os quatro membros da família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-18) são produzidos de forma semelhante ao TNF- α e, frequentemente, são encontrados juntos em inúmeros cenários inflamatórios (WAGNER e ROTH, 2000; EL ALWANI *et al.*, 2006). Seus efeitos fisiológicos são essencialmente, idênticos aos do TNF- α , entretanto, a IL-1 β não induz, por si só, lesão tecidual ou morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- α (WAGNER e ROTH, 2000; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; EL ALWANI *et al.*, 2006).

A secreção das citocinas TNF- α e IL-1 β , mesmo que transitória, é suficiente para induzir, dentre outros mediadores, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias secundárias, incluindo IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF e MIP-1 α/β (FEGHALI e WRIGHT, 1997; WITKAMP e MONSHOUWER, 2000; HE *et al.*, 2007).

A IL-6 também possui efeitos sistêmicos. Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos secretam esse polipeptídeo, que exibe muitas das ações inflamatórias da IL-1 β e do TNF- α (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; EL ALWANI *et al.*, 2006). A IL-6 é o principal sinal para a resposta de fase aguda hepática e serve como fator de crescimento para linfócitos B (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; EL ALWANI *et al.*, 2006). Entretanto, enquanto o TNF- α e a IL-1 β induzem a produção de IL-6, esta última inibe a síntese dos primeiros, produzindo desta forma, um efeito anti-inflamatório por meio de *feedback* (retroalimentação) negativo (EL ALWANI *et al.*, 2006).

A IL-1 β , TNF- α e IL-6 possuem efeitos sistêmicos quando secretadas em quantidades suficientes. Essas citocinas induzem as células do fígado (hepatócitos) a produzir proteínas de fase aguda, como proteína C-reativa e fatores de coagulação, e elas ativam as células endoteliais do cérebro a produzir prostaglandinas, incluindo a principal prostaglandina pró-inflamatória, PGE₂ (PECCHI *et al.*, 2009).

As quimiocinas por sua vez, compreendem uma família de fatores secretados por leucócitos e células endoteliais em resposta ao dano tecidual e a outros mediadores inflamatórios. São pequenas proteínas quimioatratantes que interagem fisicamente com os componentes da matriz extracelular, controlando a migração de leucócitos (ALLER *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2007). As duas maiores famílias de quimiocinas são do grupo CXC e CC, cuja atividade difere quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efetoras (HE *et al.*, 2007). As quimiocinas CXC como a IL-8, KC/CXCL1, o peptídeo ativador de neutrófilos, o fator plaquetário (PAF), o peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais (ENA)-78, atraem preferencialmente neutrófilos para o sítio inflamatório (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003; BERGIN *et al.*, 2010; KHAJAH *et al.*, 2011). Enquanto que as quimiocinas do grupo CC como a eotaxina, a citocina regulada sob ativação que é expressa e secretada por células T normais (RANTES) e a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) ativam predominantemente eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2007; ANSARI *et al.*, 2011).

A quimiocina derivada de queratinócitos (KC/CXCL1) é uma das principais moléculas relacionada com a mobilização dos neutrófilos para os tecidos durante o processo inflamatório em roedores (GRESPLAN *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009; PHILLIPSON e KUBES, 2011). O mecanismo de ação da KC/CXCL1 é dependente da ligação e ativação do receptor CXCR2, expresso nessas células (RITZMAN *et al.*, 2010), além disso, Zhang *et al.* (2001) demonstraram que a KC/CXCL1 induz o aumento da expressão da P-selectina, facilitando a adesão e rolamento dessas células na superfície do endotélio. Níveis elevados dessa quimiocina têm sido observados em modelos experimentais de doenças inflamatórias, recentemente foi demonstrado que a KC/CXCL1 desempenha um papel crítico no desenvolvimento da artrite e cardite em modelo murino de doença de Lyme, tornando-se um importante alvo terapêutico para o tratamento dessas doenças (RITZMAN *et al.*, 2010).

O MCP-1 (CCL2), um quimiotático para monócitos, é um membro da subfamília CC, e foi originalmente isolado de fibroblastos de rato 3T3 (ANSARI *et al.*, 2011; COCHRAN *et al.*, 1983). Esta quimiocina é produzida por muitos tipos de células, incluindo epiteliais, endoteliais, musculares lisas, fibroblastos, astrócitos, monócitos e células da microglia e recruta monócitos, células T de memória, e as células dendríticas para os locais de lesão tecidual e infecção (YADAV *et al.*, 2010). Estas células são importantes para respostas imunes contra vírus tanto na circulação periférica como nos tecidos. No entanto seu alvo principal são monócitos e macrófagos e sua atividade é controlada por IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 (YOSHIMURA, ROBINSON, *et al.*, 1989; YOSHIMURA, YUHKI, *et al.*, 1989; ANSARI *et al.*, 2011). As citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 são secretadas pelo Linfócito T auxiliar do tipo Th2 (FIORENTINO *et al.*, 1989). O MCP-1 e outras quimiocinas são normalmente expressos no tecido durante a inflamação e são induzidos por mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-1 β , e LPS (PROOST *et al.*, 1996).

O receptor CCR2 (ligante do MCP-1) desempenha papel crucial no recrutamento de monócitos durante a infecção ou outras condições inflamatórias (TSOU *et al.*, 2007). A expressão desse receptor depende da invasão bacteriana no citosol da célula hospedeira. Entretanto, em condições não inflamatórias, promove a migração homeostática de monócitos da medula óssea para a circulação sanguínea (SHI e PAMER, 2011). O MCP-1 também contribui para a migração de monócitos e células dendríticas da medula óssea para o baço durante a infecção por *L.*

monocytogenes. A falta dessa quimiocina ocasiona uma depuração diminuída de bactérias no baço e aumenta a suscetibilidade à infecção (JIA *et al.*, 2008). Da mesma forma, a presença de células inflamatórias nas articulações de pacientes com artrite reumatóide tem sido explicada pela presença IL-8 e MCP-1 no líquido sinovial (KOCH *et al.*, 1992; SHAHRARA *et al.*, 2008).

1.3.3 Prostaglandina E2 (PGE₂)

Os prostanóides são metabólitos do ácido araquidônico (AA) derivados da via das ciclooxigenases (COXs), tais como prostaglandinas (PG) D₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, prostaciclina e tromboxanos, que possuem sua biossíntese significativamente aumentada nos tecidos inflamados. A PGE₂ e PGI₂ são os principais prostanóides com ação pró-inflamatória (SMYTH *et al.*, 2009). A PGE₂ é dotada de potente atividade vasodilatadora, sendo uma das substâncias responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema presentes na inflamação aguda (SOLOMON *et al.*, 1968). A PGE₂ é um dos componentes fundamentais na inflamação, na dor, no câncer, como também é conhecida por regular as funções fisiológicas do trato gastrointestinal e no rim, e quando produzida localmente, induz populações específicas de neurônios no sistema nervoso central, promovendo um comportamento de doença como: febre, anorexia, fadiga, sonolência e retraimento social (SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007; PECCHI *et al.*, 2009).

A PGE₂ é formada a partir do AA por ação das ciclooxigenases que catalisam a síntese de PGH₂, para posteriormente ser transformada em PGE₂ pela ação da PGE₂ sintase (PGES) (SAMUELSSON *et al.*, 2007). Existem pelo menos três isoformas de PGES humanas clonadas e caracterizadas, como PGES associadas à membrana (mPGES-1, mPGES-2), e PGES citosólicas (cPGES) (KOJIMA *et al.*, 2004). A cPGES é dependente de glutatona, expressa constitutivamente e é mais eficiente em metabolizar os produtos da COX-1 quando comparados aos da COX-2 (CLAVEAU *et al.*, 2003). Por outro lado, a expressão da mPGES é induzida principalmente por estímulos inflamatórios, tem sua expressão reduzida por glicocorticoides e é funcionalmente acoplada à COX-2 (KAMEI *et al.*, 2004). Sugerindo que existe uma indução coordenada da COX-2 e mPGES em processos

inflamatórios. De fato, existem inúmeras evidências de que a produção de prostanoídes, como a PGE₂, por meio da via da COX-2, tem um papel relevante no processo inflamatório. A COX-2 está expressa em muitos tecidos inflamados tais como a sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (CROFFORD *et al.*, 1994), bem como em vários modelos experimentais de inflamação (VANE *et al.*, 1994; ANDERSON *et al.*, 1996). A mPGES-1 é responsável pela produção excessiva PGE₂ ligada a patologias (JAKOBSSON *et al.*, 1999) e resultados obtidos em experimentos com camundongos knockout e com inibidores seletivos para a mPGES-1 sugerem um papel-chave na inflamação, dor, febre, aterosclerose e formação de tumores (SAMUELSSON *et al.*, 2007; FRIESEN e MANCINI, 2008; KOEBERLE e WERZ, 2009).

Altos níveis de PGE₂ são encontrados em exsudatos inflamatórios e a injeção de PGE₂ diretamente dentro do tecido, produz uma série de sinais clássicos da inflamação (WILLIAMS e HIGGS, 1988). Interessantemente, existe uma série de estudos que sugere que a PGE₂ atua sinergicamente com outros mediadores, como a histamina e bradicinina, especialmente na dor e edema associados aos processos inflamatórios (KINGSTON e GREAVES, 1985; WILLIAMS e HIGGS, 1988; ARMSTRONG *et al.*, 1995). Além dessas ações, a PGE₂ também pode regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias (HINSON *et al.*, 1996; WILLIAMS e SHACTER, 1997). Adicionalmente, anticorpos seletivos para a PGE₂ são capazes de bloquear a inflamação, hiperalgesia, assim como a produção da IL-6 na inflamação induzida pela carragenina e na artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos (PORTANOVA *et al.*, 1996). Em conjunto, essas evidências mostram o importante papel exercido pela enzima COX-2 e pela produção de PGE₂ nos processos inflamatórios periféricos.

1.3.4 Bradicinina

As cininas constituem peptídeos formados no plasma e em tecidos periféricos em resposta a ativação de enzimas denominadas calicreínas, atuando em substratos cininogênicos. As cininas atuam em diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo o controle da pressão arterial, contração ou relaxamento de músculo liso,

permeabilidade vascular e na transmissão da dor (BHOOLA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 2002).

Em mamíferos já foram identificadas três cininas importantes: bradicinina (BK), Lys-bradicinina e des-Arg9-bradicinina (MARCEAU e REGOLI, 2004).

Os efeitos da BK (nonapeptídeo) no processo inflamatório dependem da interação entre BK e um dos dois subtipos de receptores B1 e/ou B2 (MARCEAU e REGOLI, 2004). Os receptores B1 são escassamente expressos em tecidos normais (saudáveis), mas sua expressão pode ser aumentada sob condições particulares, como injúria e infecção. Por exemplo, o desafio com LPS ou citocinas como TNF- α e IL-1 β por meio da ativação de componentes da via MAPKs ou NF κ B podem induzir a super expressão de receptores B1 (NODA *et al.*, 2003). Por outro lado, os receptores B2 são expressos constitutivamente e distribuídos em diversos tecidos (MARCEAU e REGOLI, 2004).

Além de estrutura primária da BK, seus metabólitos (Lys-bradicinina e des-Arg9-bradicinina) também são capazes de interagir com os receptores B1 e B2. A BK por ser um mediador inflamatório e vaso depressor é um componente essencial na mobilização de Ca²⁺ intracelular (NODA *et al.*, 2003) e antagoniza a angiotensina II ligando-se diretamente com receptores da angiotensina II tipo 1 (AT1) nas células de músculo liso (MARCEAU e REGOLI, 2004).

Estudos têm demonstrado que o receptor B2 participa na indução dos sinais cardinais da inflamação aguda, incluindo aumento de permeabilidade vascular, vaso constrição e dor por meio da ativação de fibras sensoriais (MCLEAN *et al.*, 2000). O receptor B1, calicreínas e cininogênios foram encontrados na superfície de neutrófilos circulantes e sinoviais, demonstrando um possível papel efetor do sistema cinina no sítio de inflamação (ARAUJO *et al.*, 2001). Contudo, tem sido sugerido que receptores B2 estejam envolvidos na fase aguda da inflamação e resposta da dor, ao passo que, B1 participa da fase crônica da resposta inflamatória (CALIXTO *et al.*, 2000; NODA *et al.*, 2003).

Além de tecidos periféricos, a bradicinina exerce atividades fisiológicas no sistema nervoso central (SNC) (WALKER *et al.*, 1995). Uma vez formada na periferia, a bradicinina ativa fibras A δ e C nos nervos sensoriais, produzindo dor,

hiperalgesia ou alodinia, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (WALKER *et al.*, 1995). Além disso, acredita-se que as cininas exerçam um papel indireto sobre o processo inflamatório a partir da liberação de mediadores pró-inflamatórios e hiperalgésicos (WALKER *et al.*, 1995; CALIXTO *et al.*, 2001).

1.3.5 Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma pequena molécula lipofílica gasosa, capaz de difundir-se facilmente através das membranas biológicas. Trata-se, na verdade, de um radical livre, que pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original (BRUCKDORFER, 2005).

O NO é produzido por uma enzima específica chamada óxido nítrico sintase (NOS) a partir do precursor L-arginina. Inicialmente foram descobertas três formas da NOS e todas são constituídas por um domínio oxigenase e um domínio redutase, duas das quais são constitutivas, dependentes de cálcio e produzem o NO em pequenas concentrações. A outra isoforma é independente de cálcio e induzível por diversos estímulos imunológicos (KNOWLES e MONCADA, 1994). A NOS induzida por estímulo inflamatório é conhecida como iNOS (MONCADA *et al.*, 1997).

A expressão de iNOS é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles o NF- κ B. Esta enzima pode ser ativada em células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por LPS ou citocinas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6) (CHAN *et al.*, 2004; ALDERTON *et al.*, 2001).

O óxido nítrico tem efeitos disseminados em repostas fisiológicas e inflamatórias. No sistema nervoso central e periférico o NO atua como um mensageiro inter e intracelular desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia. Vários estudos têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias modulam a dor por estimular a produção de NO (FERREIRA, 1993; XU *et al.*, 1994). Nas células endoteliais, o NO difunde-se rapidamente para fora das células de origem para as células musculares lisas subjacentes, provocando relaxamento e, conseqüentemente, vasodilatação. A

vasodilatação que ocorre no processo inflamatório, induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P, serotonina e trombina), é dependente da liberação de óxido nítrico (WOTHERSPOON et al., 2005).

Além de promover o relaxamento da musculatura lisa, o NO desempenha outros papéis importantes na inflamação. Reduz a agregação e adesão plaquetária, é citotóxico para determinados microrganismos e células tumorais (CIRINO et al., 2003).

1.3.6 Moléculas de Adesão

Na inflamação, mediadores solúveis iniciam a ativação dos leucócitos e células endoteliais, enquanto que as moléculas de adesão permitem a interação dos leucócitos com a parede dos vasos e todas as interações subsequentes necessárias para a migração destas células para o tecido. A diversidade e a especificidade de ligação entre moléculas de adesão nas células endoteliais e os leucócitos permitem que a migração celular ocorra de forma ordenada em um prazo razoável para que os leucócitos encontrem e destruam os antígenos. Várias famílias de moléculas de adesão estão envolvidas nas interações celulares leucócito-endotélio. Estes incluem selectinas, integrinas e imunoglobulinas (BARREIRO et al., 2010; SUNDD et al., 2011).

A família das selectinas é composta por três moléculas diferentes: L-selectina, P selectina e E-selectina, que desempenham um papel importante na captação de leucócitos e rolamento nas células endoteliais (MCEVER, 2002).

A L-selectina é constitutivamente expressa em quase todos os leucócitos e se liga a diversos ligantes, incluindo glycam-1, CD34, e MadCAM-1 em vênulas do endotélio alto e ao sulfato de heparana no endotélio inflamado (WANG et al., 2002; PARISH, 2006). Todos os ligantes L-selectina identificados até agora partilham características comuns: são sialisados, fucosilados, sulfatados, e mostram semelhanças com o sialil Lewis x (PARISH, 2006). Relatos mostram que níveis de L-selectina no plasma estão elevados em doenças infecciosas e inflamatórias e podem

ser considerados como um fenômeno bastante inespecífico refletindo em contagens elevadas de leucócitos na circulação (INAOKI et al., 2001).

Considerando que a expressão da L-selectina é restrita aos leucócitos, a P-selectina é constitutivamente expressa em plaquetas e induzida nas células endoteliais ativadas por trombina, histamina e seu ligante presente nos leucócitos é a PSGL-1. A P-selectina é armazenada nos corpos de Weibel Palade das células endoteliais e nos grânulos das plaquetas (WALZOG e GAEHTGENS, 2000; LOWE, 2003).

A E-selectina é expressa em células endoteliais ativadas. A ativação destas células ocorre por meio de mediadores tais como TNF- α ou IL-1 β (LOWE, 2003; SUNDD et al., 2011). A E-selectina e a P-selectina contribuem para rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial (WALZOG e GAEHTGENS, 2000; SHIGETA et al., 2008; SUNDD et al., 2011).

As Integrinas medeiam à adesão firme dos leucócitos ao endotélio via ligações com as moléculas de adesão pertencentes à superfamília das imunoglobulinas expressas nas células endoteliais. Elas representam uma grande família de proteínas que são classificadas pela subunidades “ β ”, como a β 1 (CD29), β 2 (CD18), β 3 (CD61) e β 7-integrinas. Existem quatro diferentes tipos de integrinas β 2 (CD11/CD18): LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), gp150/95 (CD11c/CD18) e CD11d/CD18 (WIESNER et al., 2005). Essas integrinas medeiam a firme adesão dos leucócitos nas células endoteliais por meio da ligação às moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e membros da superfamília das imunoglobulinas que são expressos pelas células endoteliais. A mais importante β 2-integrina é a LFA-1 e exerce sua função principalmente pela ligação ao ICAM-1, que possui sua expressão aumentada no endotélio inflamado (HOGG et al., 2002; SMITH et al., 2007).

O MAC-1 também tem alguma afinidade pelo ICAM-1, mas seu papel na mediação da adesão celular parece ser menos importante. As β 1-integrinas são principalmente expressas em linfócitos e monócitos. O antígeno tardio-4 (VLA-4, very late antigen-4) desempenha um papel importante na mediação de extravasamento de monócitos induzida por ligação a molécula de adesão vascular 1

(VCAM-1, CD106) (WALZOG e GAEHTGENS, 2000; SUNDD et al., 2011). A VCAM-1 (CD106) é expressa principalmente em células endoteliais e é regulada com a estimulação de vários mediadores inflamatórios, especialmente citocinas (WALZOG e GAEHTGENS, 2000; SUNDD et al., 2011). Essa molécula tem um papel na mediação de interações leucócito-endotélio através da ligação à $\alpha 4/\beta 1$ e o $\alpha 4/\beta 7$ -integrinas, bem como a $\beta 2$ -integrinas CD11d/CD18. A molécula de adesão de plaquetas células endoteliais (PECAM-1) (CD31), outro membro da família de imunoglobulinas, é altamente expresso nos PMN e monócitos (WALZOG e GAEHTGENS, 2000; SUNDD et al., 2011).

As moléculas participantes no processo de adesão leucocitária constituem alvos de vários agentes anti-inflamatórios, como glicocorticoides, por diminuírem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e na superfície do neutrófilo, ou salicilatos, que bloqueiam a ativação de MAC-1 levando a inibição da adesão neutrofílica (FILEP et al., 1997; PILLINGER et al., 1998).

1.4 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

O emprego de plantas na medicina popular frequentemente realizada e fundamentada na recuperação de enfermidades e manutenção da saúde. Apesar do surgimento dos medicamentos sintéticos, os estudos de plantas medicinais continuam sendo extensivamente explorados, tendo em vista a grande biodiversidade em todo nosso planeta, em especial os países tropicais (GILANI e ATTA UR, 2005). A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas é conhecidos por interferir, direta ou indiretamente, nos metabólitos do AA, nas citocinas, na produção e/ou ação de segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, proteínas quinases e cálcio; expressão de fatores de transcrição como o NF-kB, e de proto-oncogenes, c-jun e c-fos, e na intervenção da expressão de moléculas pró-inflamatórias como a iNOS, COX-2, IL-1 β , TNF- α , neuropeptídeos e proteases (CALIXTO et al., 2003).

Muitas plantas, cuja indicação popular atua na inflamação, são alvos para o estudo de novas terapêuticas para esta área. O uso popular, como também novas ações terapêuticas são muitas vezes confirmados pelos resultados das pesquisas científicas (PEREIRA et al., 1999; Bezerra-Santos et al., 2006; ZAKARIA et al., 2010). O picão, nome popular da planta *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), é popularmente usado para o tratamento de inflamações, hepatite, icterícia neonatal e diabetes (PEREIRA et al., 1999; HORIUCHI e SEYAMA, 2006; HORIUCHI et al., 2010). Estudos comprovaram suas ações imunossupressora (PEREIRA et al., 1999) e anti-inflamatória por inibir a produção de IgE, liberação de histamina pelos mastócitos, o aumento da permeabilidade vascular, além de prevenir a progressão das lesões da mucosa gástrica induzidas por HCl/EtOH, indometacina e estresse pelo frio. Esta planta é rica em flavonoides e derivados do ácido cafêico, que têm comprovada ação captadora de radicais livres (HORIUCHI e SEYAMA, 2006; HORIUCHI et al., 2010).

Phlebodium decumanum (Polypodiaceae) uma planta da medicina tradicional da América Central, apresentou propriedades anti-inflamatórias por inibir a secreção de citocinas, como TNF- α por macrófagos ativados. Curiosamente, esse efeito parece ser específico sobre a secreção de TNF- α , uma vez que a secreção de IL-1 β não foi afetada e a IL-6 foi fracamente inibida (PUNZON et al., 2003).

Estudos realizados com *Piper sarmentosum* (Piperaceae) uma planta medicinal tradicionalmente usada pelos malaios para tratar dores de cabeça, dores de dente, tosse, asma e febre, demonstraram potencial antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos animais (RUKACHAISIRIKUL et al., 2004). A atividade antinociceptiva da *P. Sarmentosum* foi demonstrada em testes de contorção abdominal e placa-quente. Estes testes sugeriram o potencial do extrato em inibir os estímulos nocivos químicos e térmicos na resposta inflamatória e não inflamatória relacionadas a nocicepção (ZAKARIA et al., 2010). Além disso, extrato da *P. Sarmentosum* também foi capaz de diminuir o edema de pata induzido por carragenina, indicando o seu potencial como agente anti-inflamatório (ZAKARIA et al., 2010). Este estudo demonstrou que a planta possui promissoras atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, confirmando assim, a utilização da planta pela medicina popular para o tratamento de várias doenças mediadas pela dor inflamatórias.

Inula viscosa (Compositae) tem sido considerada uma das plantas medicinais mais importantes da bacia do Mediterrâneo, e sua atividade anti-inflamatória tem sido amplamente divulgada (MANEZ et al., 1999). Sesquiterpenos isolados do extrato das folhas dessa planta apresentaram efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* (HERNANDEZ et al., 2001). Vários estudos sugerem que o possível mecanismo para esta atividade esteja relacionado com a capacidade do extrato em inibir a atividade da COX-1, COX-2 e iNOS (MANEZ et al., 2007; KHAN et al., 2010).

Em um outro estudo, lactonas sesquiterpênicas derivadas das folhas de *Inula viscosa* demonstrarem possui atividade contra o melanoma e células de câncer de próstata (BAKSHI et al., 2004; ROZENBLAT et al., 2008), Curiosamente, foi descoberto que os sesquiterpenos, Tomentosina e Inuviscolida reduziram a expressão da p65 (NF-kB) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT1), causando diminuição da produção de IL-2, IL-1 β , IFN- γ , e TNF- α , enquanto que a produção de IL-6 não foi afetada (ABRHAM et al., 2010).

A *Uncaria tomentosa* uma erva peruana da família Rubiaceae, conhecida popularmente como unha-de-gato, possui indicação para doenças inflamatórias crônicas, tais como gastrite, artrite e asma (CISNEROS et al., 2005). Essa espécie contém alcaloides oxíndoles e indoles, glicosídeos triterpenóides, esteróis e

flavonoides, que individualmente ou em sinergia contribuem para suas propriedades terapêuticas (HEITZMAN et al., 2005). Sua ação é devido, em parte, a capacidade de inibir a produção de TNF- α e da PGE₂, e esta inibição parece envolver a ativação da via da MAP quinase (inibindo a fosforilação da ERK) e do NF- κ B (AKESSON et al., 2003; CISNEROS et al., 2005; ALLEN-HALL et al., 2007).

Cissampelos sympodialis Eichl. (Menispermaceae) é uma espécie da flora brasileira, Popularmente conhecido no Brasil como “milona”, “jarrinha”, “orelha-deonça” e “abuteira”, cujas folhas e raízes são empregadas na medicina popular no tratamento da asma, bronquite, gripe e reumatismo (PIO CORRÊA, 1984; (BARBOSA-FILHO et al., 1997). Estudos farmacológicos com *C. sympodialis* têm demonstrado que a fração aquosa do extrato etanólico das folhas inibiram o broncoespasmo induzido pela histamina em cobaias sensibilizadas com ovalbumina (OVA), além da atividade das fosfodiesterases IV e V (THOMAS, G. et al., 1997; THOMAS, GEORGE et al., 1997). Estudos imunológicos In vitro mostraram que extrato da *C. sympodialis* aumentou a produção de interleucina-10 (IL-10) e inibiu a resposta proliferativa das células T em células de baço de camundongos estimulados com concanavalina-A (PIUVEZAM et al., 1999). O tratamento oral com *C. sympodialis* diminuiu a produção de IgE e inibiu a reação de choque anafilática em modelos alérgicos (BEZERRA-SANTOS et al., 2006). Estudos fitoquímicos vêm demonstrando que essa planta é rica em alcaloides, como warifteína, methylwarifteina, laurifolina, milonina e roraimina. O tratamento com o alcaloide bisbenzilisquinolinico, warifteina, reduziu os níveis de IgE específica como também a reação de choque anafilático após o desafio com OVA. Sugerindo assim que este alcaloide pode ser um dos responsáveis pelos efeitos antialérgicos da planta (COSTA et al., 2008).

1.4.1 *Chondodendron platyphyllum* (A.St.Hil) (Menispermaceae) e o alcaloide curina

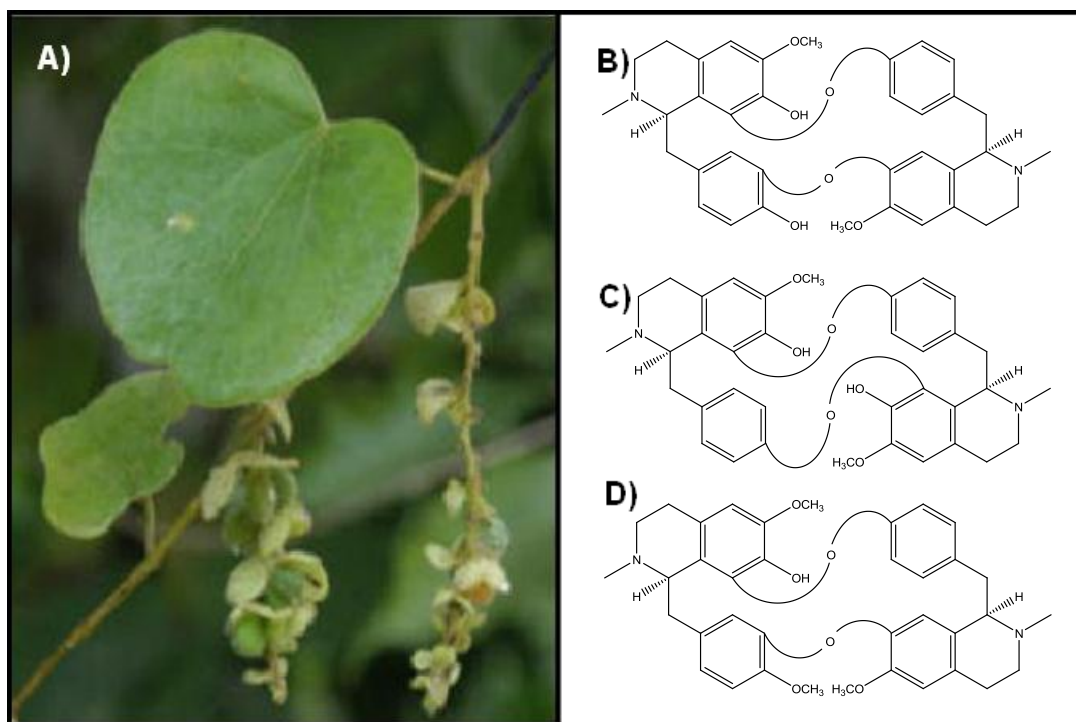
Chondodendron platyphyllum A. St. Hil (Miers) (Menispermaceae) é uma planta medicinal encontrada no nordeste do Brasil. Esta planta, popularmente conhecida como “abutua grande”, é usada na medicina popular brasileira, para alívio de sintomas de numerosas doenças, tais como anemia, diarreia e febre, (PIO CORRÊA, 1984).

A família desta planta foi estabelecida por AL de Jussieu em 1789 sendo composta por 71 gêneros e cerca de 520 espécies (pers. estimativa), fazendo parte da ordem Ranunculales (JACQUES e BERTOLINO, 2008). No Brasil é representada por cerca de 12 gêneros e 106 espécies, tendo a Amazônia como seu maior centro de distribuição (MARI, 2007). A família ficou bastante conhecida, principalmente, pelos estudos químicos e farmacológicos com gêneros tais como *Curarea*, *Abutua*, *Amnospermum*, *Cissampelos*, *Sciadotenia* e *Telitoxicum*, *Chondodendron* que são usados na preparação de curare (BISSET, 1988).

Os curares, termo genérico que descreve a expressão “veneno de flecha”, usado especialmente pelos índios do sul da Amazônia e é popularmente conhecido como: “curare”, “pareira-brava”, “pareira”, “uva-da-serra”, “uva-do-mato”. Na América do Sul, os curares são preparados por meio da infusão da planta e o extrato concentrado resulta da lenta evaporação do solvente. Os curares são conhecidos por promover uma atividade relaxante na musculatura esquelética, competindo com a acetilcolina pelo receptor nicotínico (BISSET, 1988; BARBOSA-FILHO et al., 1997).

A família Menispermaceae é bem conhecida pela produção de vários tipos de alcaloides (BARBOSA-FILHO, 2000). Estudos fitoquímicos utilizando as cascas das raízes de *C. platyphyllum* demonstraram que essa planta é rica em alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, tais como isocurina, curina (DIAS et al., 2002) e 12-O-metilcurina (GUEDES et al., 2002).

Figura 4 - A) Fotografia das folhas e caule de *C. Platyphyllum* e Alcaloides Bisbenzilisquinolínicos de *C. platyphyllum*. B) curina; C) isocurina; D) O-metil-curina



(Fonte: RIBEIRO-FILHO, 2011).

Os alcaloides bisbenzilisquinolínicos são obtidos biogeneticamente a partir da dimerização oxidativa do núcleo básico benzilisquinolínica. Algumas bases possuem uma ligação difenil éter, embora existam algumas com duas ou três, devido a diferentes sítios, onde pode ocorrer a dimerização. Esse grupo de alcaloides representa um excelente exemplo de diversidade que foi descoberto através de produtos naturais relacionados (BARBOSA-FILHO et al., 1997). Alcaloides que possuem o núcleo benzilisquinolínico são dimerizados por meio de ligação éter, e formado por três anéis: A, B e C onde a numeração do anel C é determinada pelas posições dos substituintes, de modo que sejam atribuídas numerações menores aos carbonos substituídos (BARBOSA-FILHO et al., 1997).

Os alcaloides bisbenzilisquinolínicos são conhecidos por terem várias atividades farmacológicas inclusive atividade antiparasitária, em particular contra *Leishmania* sp. (FOURNET et al., 1993), *Trypanosoma cruzi* (ROJAS DE ARIAS et al., 1994) e *Plasmodium* sp. (ANGERHOFER et al., 1999), antialérgica (BEZERRA-SANTOS, 2006; COSTA et al., 2008) e antiviral (LIOU et al., 2008)

A curina apresentou efeito vasodilatador em artéria de ratos (DIAS et al., 2002) possivelmente por bloquear os canais de Ca^{2+} -tipo L o que levou a uma diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} (MEDEIROS et al., 2011). Outros estudos demonstram que a curina apresenta efeito antialérgico por inibir a ação da histamina, a produção de IL-13 como também a migração de eosinófilos para o lavado bronquioalveolar em camundongos sensibilizados e desafiados com ovalalbumina (RIBEIRO-FILHO, 2011).

Portanto, o presente estudo visou estudar o potencial anti-inflamatório e anit-noceptivo da curina, um dos principais alcaloides da planta *C. platyphyllum* utilizada na medicina popular para o tratamento de sintomas como diarreia e febre sugerindo efeitos em processos inflamatórios e nociceptivos.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do alcaloide bisbenzilisquinolinico “curina” em modelos experimentais de inflamação aguda e nocicepção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-inflamatório da curina em modelos experimentais de edema de pata induzido por agentes flogísticos tais como: carragenina, zimosan e lipopolissacarídeo (LPS);
- Verificar o efeito anti-inflamatório da curina sobre mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina e bradicinina nos modelos experimentais de edema de pata;
- Quantificar a produção de NO em células macrofágicas da linhagem J774. A1 tratados com a curina;
- Determinar o efeito da curina sobre a permeabilidade vascular peritoneal de camundongos induzida por ácido acético;
- Avaliar o efeito da curina na migração de células inflamatórias para o lavado pleural de camundongos desafiados com LPS;
- Quantificar a produção de citocinas e quimiocinas no lavado pleural de camundongos desafiados com LPS;
- Determinar o efeito antinociceptivo da curina nos modelos experimentais de contorções abdominais, teste da formalina e hiperalgesia induzida por LPS.

MATERIAL E METODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA CURINA

As cascas do caule de *Chondodendron platyphyllum* foram pulverizadas em moinho tipo HARLEY e submetidas à extração sob percolação exaustiva com etanol a 95° GL, entre três a quatro dias por série de extração. O extrato foi concentrado a vácuo a uma temperatura em torno de 50 a 60 °C, dando origem a um extrato etanólico bruto. Este extrato foi submetido a um tratamento com uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 3% e filtrado em celite (545 FISCHER SCIENTIFIC). Esta solução ácida foi extraída com clorofórmio e em seguida alcalinizada a frio com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 8 e extraída sucessivas vezes com clorofórmio até os testes de Mayer e Dragendorff apresentarem resultados negativos. A fase clorofórmica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada no rotavapor (50°C), obtendo-se a fração de alcaloides terciários totais. A fração de alcaloides terciários foi submetida a cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada analítica e preparativa para o isolamento do alcaloide curina (DIAS, 1999). A curina foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias para a realização deste trabalho.

3.2 PREPARO DA CURINA

A curina foi preparada dissolvendo-se 1 mg de substância em 50 µL de HCl 1N e em seguida adicionando-se 500 µL de solução salina (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado entre 7-8 com hidróxido de sódio (NaOH) 1N e o volume completado para 1000 µL. Diluições em salina foram realizadas para obter as concentrações necessárias para os ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os tratamentos foram realizados 1 hora antes do desafio para todos os experimentos realizados.

3.3 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos Swiss machos (25 a 35g) ou camundongos C57/B6 machos (20 e 30g). Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais, do Centro de Biotecnologia (antigo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - LTF) da Universidade Federal da Paraíba e aprovado pelo comitê de ética com CEPA nº 0202/10 e pela Criação da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) - Rio de Janeiro-RJ (aprovado pelo comitê de ética com CEUA nº 002/08). Os animais foram mantidos com livre acesso a água e alimento em uma sala com temperatura variando de 22 a 24 ° C, em ciclos claro/escuro de 12h.

3.4 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Grupos de animais (n=6-8) foram tratados por via oral (v.o) com curina (0,625, 2,5 ou 10 mg/kg), drogas-padrão (dexametasona 2,0 mg/kg, via subcutânea (s.c); Sigma Chemical CO. St. Louis, MO; morfina 10 mg/kg, via intraperitoneal (i.p); Merck–EUA ou indometacina 10 mg/kg, i.p; Prodome, NJ, EUA - ind 20) ou veículo (grupo controle positivo) 1 hora antes do desafio com o agente flogístico. O grupo salina (grupo controle negativo) correspondeu aos animais que receberam salina sem serem desafiados com o agente flogístico. O edema de pata foi avaliado pela medida do inchaço com um paquímetro digital (great, mt – 04513).

Para definir a dose de curina que apresentasse efeito farmacológico, o teste de edema de pata induzido por carragenina foi utilizado. Os tratamentos dos animais com diferentes doses de curina (0,625, 2,5 ou 10 mg/kg) apontaram a dose de 2,5 mg/kg como sendo a menor dose com efeito anti-inflamatório neste teste. Essa dose também não apresentou efeito tóxico como descrito por Ribeiro-filho, (2011).

3.5 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DIVERSOS AGENTES FLOGÍSTICOS

Esta abordagem experimental baseia-se no fato de que a administração de agentes flogísticos na pata de um animal produz uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente mensurável. Os agentes flogísticos são compostos que induzem um processo inflamatório no tecido com os quatro sinais cardinais devidamente representados. Antes da realização dos experimentos, a espessura das patas traseiras dos camundongos foram medidas com um paquímetro digital (GREAT, MT – 04513) e a diferença entre a pata direita e esquerda foram consideradas como a medida basal. Uma hora após os tratamentos (curina ou dexametasona), os camundongos foram desafiados pela administração intraplantar com 20 μ L de soluções contendo carragenina (500 μ g/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), zimosan (200 μ g/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), LPS (25 μ g/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA), PGE₂ (5 nmol/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA) ou bradicinina (3 nmol/pata; SIGMA CHEMICAL Co, EUA) na pata esquerda e com 20 μ L de salina na pata direita. A diferença entre a espessura da pata traseira direita e esquerda foi avaliada nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação da carragenina; 1, 2, 3 e 4 h após a injeção com zimosan e 24, 48, 72, 96 h após a aplicação do LPS. Os edemas induzidos pela prostaglandina E2 (PGE₂) e bradicinina foram mensurados nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a aplicação desses agentes flogísticos. Os edemas foram calculados pela diferença obtida entre o diâmetro da pata esquerda e direita nos tempos indicados usando novamente o paquímetro digital (CASTARDO et al., 2008; NAIDU et al., 2010).

3.6 CULTURA DE CÉLULAS DE LINHAGEM CONTÍNUA

Macrófagos (macrófago/monócito) murinos da linhagem J774 A.1 (Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil) oriundos de um sarcoma de camundongos BALB/c foram cultivados em meio de cultura celular RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) COMPLETO (estreptomicina - 10mg/mL, penicilina - 6mg/MI, kanamicina - 2mg/m (Gibco, Grand Island, NY, USA) e 10% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA) à 37°C e 5% de CO₂. Repiques semanais para o estabelecimento da cultura celular foram realizados.

3.7 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE (CC50)

A concentração citotóxica de 50% (CC50) da curina foi avaliada pelo indicador de oxi-redução (redox) alamar blue (AB; Biosource, Camarillo, CA) conforme Al-Nasiry *et al* (2007). Esta técnica baseasse no fato de que células viáveis reduzem o *Alamar Blue* ou resazurina (azul e não fluorescente) a *resorufina* (róseo e altamente fluorescente). Esta análise é realizada pela quantificação de células viáveis pelos valores obtidos em absorbância, sendo um método de avaliação colorimétrica.

Para este experimentos macrófagos J774-A.1 após adquirirem semi-confluência em cultura celular, foram lavados uma vez com a solução tampão Hanks e então tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, ajustando o número de células para 2×10^5 células/mL em meio RPMI completo. As células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. A seguir foram preparadas diferentes concentrações de curina (0,5 a 250 µg/mL), as quais foram adicionadas as células, sendo incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Como controle negativo as células foram cultivadas em meio RPMI. A doxorrubicina (10µg/mL; Eurofarma, São Paulo, SP, BR) foi utilizada como controle positivo neste bioensaio.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e a seguir foram adicionados 20µL de alamar blue e 180 µL de meio RPMI completo. Seis horas após o período de incubação, a absorbância foi medida em filtros de 570 nm (estado

oxidado) e 595 nm (estado reduzido) no leitor de ELISA (BIORAD 640) e a leitura visual da placa foi feita pelo indicador redox, onde a cor azul oxidada representa morte celular e a cor lilás representa células viáveis. Os dados foram analisados em curva de regressão linear (GraphPadPrism versão 5.0, GraphPad Software, California, USA) e os resultados foram expressos como CC50. Os experimentos foram realizados em triplicata. A percentagem de Alamar blue reduzido foi calculada segundo a fórmula:

% reduzido = $ALW - (AHW \times RO) \times 100$, onde:

ALW = representa a leitura do estado oxidado

AHW = representa a leitura do estado reduzido

RO = representa a divisão AOLW/ AOHW

AOLW = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em baixo comprimento de onda

AOHW = representa a absorbância do meio sozinho subtraído da absorbância do meio com Alamar blue em alto comprimento de onda.

3.8 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO EM MACRÓFAGOS.

As linhagens de macrófagos são muito utilizadas para avaliar a produção de diversos mediadores inflamatórios e citocinas (KLASING, 1998). Adicionalmente, o IFN- γ (interferon gama) e o LPS (lipopolissacarídeo) atuam sinergicamente na produção de altas concentrações de NO em cultura de macrófagos (PUFAHL et al., 1992).

A síntese de NO foi avaliado pelo método indireto pelos níveis de nitrito utilizando a reação de Griess (NATHAN e XIE, 1994). Este teste baseia-se no fato que o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática, produzindo um sal de diazônio. Este sal reagirá com a 3-hidroxi-1,2,3,4-tetraidrobenzilquinolina, uma molécula orgânica, e resultará em um produto solúvel de coloração rósea. A coloração resultante tem intensidade de cor em proporção direta com a concentração de nitrito na amostra de acordo com uma curva padrão

recem preparada. Para quantificação do nitrito, foram utilizadas alíquotas de 0,1 mL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos J774 A.1 tratadas na presença de curina (em concentrações entre 0,01, 0,1 ou 1 µg/mL). Os sobrenadantes foram incubados com igual volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% de dihidroclorato de N-(1-naphtil)-etilenodiamina, 2,5% H₃PO₄) em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi lida em leitor de Elisa em filtro de 540 nm (Titer tek Multiskan Reader). Como controles positivos foram utilizadas concentrações de 100 U/mL de IFN-γ (Recombinant Mouse IFN-γ/BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) e 50 ng/ml de LPS (Lipopolisacarídeo *Escherichia coli* Sorotipo 0111:B4 – Sigma, St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes e materiais encontravam-se livres de LPS (< 0.2 ng/mL de endotoxina) parâmetros determinados pelo ensaio Limulus de lisado de amebócitos (Sigma).

3.9 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 0,6% provoca reação inflamatória local envolvendo a liberação de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, que pode ser quantificada por meio de corantes específicos. O azul de Evans tem sido amplamente utilizado em diversos trabalhos experimentais, devido apresentar características como inocuidade, alta solubilidade em água e afinidade pela albumina. O azul de Evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada, sendo então quantificados por métodos colorimétricos. Para este experimento, utilizou-se 4 grupos de camundongos que foram tratados previamente com indometacina (10 mg/kg, i.p), curina (2,5 mg/kg, v.o) ou salina (v.o) e, uma hora após esses tratamentos, os animais receberam o ácido acético (300µL a 0,6%) intraperitonealmente. Uma solução contendo azul de Evans (1% -intravenosa) foi injetada 20-30 min antes da inoculação do ácido acético. Vinte minutos após o desafio com ácido acético os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram posteriormente os peritônios lavados com 10 mL de água destilada. Após

esse procedimento as amostras obtidas dos peritônios foram transferidas para tubos do tipo falcon. As soluções foram centrifugadas (CR422, JONAM) por 10min/1500 rpm/8 °C e transferidas para placas de 96 poços (NUNC-Immuno™), para posteriormente serem analisadas com comprimento de onda de 620 nm, utilizando o espectrofotômetro (ELx808 Absorbance Microplate Reader) (WHITTLE, 1964).

3.10 PLEURISIA INDUZIDA POR LPS

Este teste baseia-se no fato de que a administração intrapleural (i.pl) de uma solução de LPS na cavidade pleural de camundongos provoca reação inflamatória, envolvendo liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células imunes, incluindo macrófagos e células dendríticas, e influxo de neutrófilos de forma tempo-dependente para a cavidade pleural de camundongos, detectável a partir de 2 horas e com pico máximo entre 8-24 h. Mimetizando assim a resposta imune inata à infecção bacteriana. Este modelo nos permite avaliar o efeito tratamento sobre a migração de células inflamatórias para o sítio inflamatório, como também sobre a produção de citocinas e quimiocinas (Sousa et al., 2010). Para este experimento 4 grupos de camundongos foram tratados previamente com dexametasona (2.0 mg/kg, s.c), curina (2,5 mg/kg v.o) ou salina (v.o) e 1 hora após os tratamentos, camundongos C57BL/6 receberam uma administração intrapleural (i.pl) de LPS (250 ng/cavidade, Lipopolissacarídeo *Escherichia coli* Sorotipo 0111:B4 – Sigma, St. Louis, MO, USA) ou salina. Quatro e 24 h após a administração do LPS, os animais foram eutanasiados sob atmosfera de CO₂ e as células presentes na cavidade pleural foram colhidas por lavagem com 1mL de PBS gelado. Posteriormente, o lavado pleural foi transferido para tubo do tipo ependorff e centrifugados (CR422, JONAM) a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de citocinas. O pellet de células resultante da centrifugação, foi ressuscitado em PBS para realização da contagem de células total e diferencial.

3.10.1 Contagem total e diferencial de leucócitos do lavado pleural

A contagem total das células no lavado pleural foi realizada utilizando a câmara de Neubauer. Antes da montagem da câmara para a contagem das células ao microscópio, as amostras foram diluídas em solução de Turk. Para contagem diferencial, lâminas de microscopia foram montadas e centrifugadas em citocentrífuga (Citospin- FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400) para tal 100µL da suspensão de células de cada amostra foi inserida nos seus respectivos orifícios das lâminas de citospin e então centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm. As células foram coradas com a coloração de May-Gruanwald-Giemsa e a contagem diferencial foi realizada com objetiva de imersão (1000X aumento final). A contagem diferencial foi realizada usando o padrão de critérios morfológicos para identificar os tipos de células (Sousa et al., 2010).

3.10.2 Dosagem de citocinas e quimiocinas

Os níveis das citocinas foram determinados utilizando imunoensaio com microesferas do tipo multiplex. O imunoensaio multiplex consiste na detecção de várias proteínas em um mesmo poço da placa de microtitulação (NUNC-Immuno™) utilizando microesferas com anticorpos específicas para cada citocina (CESBRON-GAUTIER et al., 2004; HEIJMANS-ANTONISSEN et al., 2006). Para a realização de tal experimento foram utilizados 50 uL de sobrenadantes das amostras dos lavados pleurais para a determinação das citocinas/quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e KC/CXCL1). OS kits utilizados foram procedentes da Lincoplex, Millipore, Missouri, USA e as análises realizadas em um aparelho denominado Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as amostras foram plaqueadas em placas de 96-poços (NUNC-Immuno™) com filtro no fundo. As placas foram pré-umedecidos com tampão de lavagem e a solução foi aspirada dos poços usando uma sucção à vácuo (Millipore Corporation, Billerica, MA). Microesferas revestidas com anticorpos monoclonais para os 5 alvos (citocinas acima mencionadas) foram adicionadas aos poços. Amostras e padrões (variando de 0,13 a 2.000 pg/mL para cada análise)

foram adicionados aos poços e as placas incubadas durante a noite a 4°C. Os poços foram lavados e aspirados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada aos poços da placa e então incubada por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). Os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por mililitro (pg/mL).

3.11 TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Este teste baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 1% provoca irritação peritoneal, envolvendo estimulação dos nociceptores, gerando reações comportamentais, sendo tal efeito nociceptivo caracterizado por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores. Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER *et al.*, 1959). Para este experimento, utilizou-se três grupos de 8 camundongos, onde os grupos receberam por via oral o pré-tratamento da com a curina (2,5 mg/kg), veículo ou morfina (10 mg/kg). Após 1 hora os animais foram desafiados com uma solução de ácido acético 1% (0,1 mL/10 g) e colocados em caixas de polietileno individuais, sendo então observada a latência para o aparecimento da primeira contorção nos cinco primeiros minutos do experimento. Em seguida, registrou-se o número total de contorções abdominais apresentado por cada animal durante 10 minutos de observação. Redução estatisticamente significativa do número de contorções quando comparado ao grupo controle (Ac. acético) foi considerada uma resposta antinociceptiva (NARAYANAN *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2006).

3.12 TESTE DA FORMALINA

O teste da formalina foi realizado como descrito por Vaz *et al.*, (1996). Nesta metodologia, uma solução de formalina é injetada na região subplantar do camundongo, o que induz à estimulação dos nociceptores, sendo o tempo de lambida da pata considerado indicativo de resposta nociceptiva (SOUZA *et al.*, 2000). Esse teste consiste de duas fases: A primeira fase ocorre normalmente nos 5 primeiros minutos após a injeção da formalina e, provavelmente, é resultante da estimulação direta dos nociceptores, levando a uma resposta neurogênica. A inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas que atuam em nível central. Em seguida, há uma interfase de aproximadamente 10 minutos caracterizada por mecanismos inibitórios da dor. A segunda fase (15-30 minutos) é conhecida principalmente por uma resposta inflamatória, gerada tanto pela estimulação de nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Neste experimento, grupos de 8 camundongos receberam o pré-tratamento com a curina (2,5 mg/kg v.o) , veículo (v.o), morfina (10 mg/kg i.p) ou dexametasona (2,0 mg/kg s.c). Uma hora após os tratamentos, 20 µL de solução de formalina (2,5%) foi injetada na região subplantar da pata posterior direita de cada camundongo. Em seguida, esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo de lambida da pata que recebeu a formalina durante 5 minutos (1ª fase). Após um período de 10 minutos (interfase), foi contabilizado o parâmetro citado por mais 15 minutos, correspondente à 2ª fase.

3.13 HIPERALGESIA INDUZIDA POR LPS

A hiperalgesia foi induzida pela administração intraplantar de LPS (25 µg/50 µL de salina) em ambas as patas traseiras, e o comportamento nociceptivo foi avaliado 24 h após no teste da placa-quente (NAIDU *et al.*, 2010). Este teste consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, a partir do momento em que o animal é colocado sobre a placa quente (55 ± 1 °C) até apresentar o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das

patas traseiras, sendo essas respostas indicativas de nocicepção. O estímulo térmico do teste da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica (ALGHAMDI, 2001). Os animais foram submetidos a uma triagem inicial (resposta até 15 s), com a finalidade de se avaliar a sensibilidade dos mesmos ao estímulo térmico. Para esta abordagem experimental, grupos de 8 camundongos cada receberam o tratamento oral com a curina (2,5 mg/kg v.o), veículo (v.o) ou dexametasona (2 mg/kg s.c) 23 h após a administração de LPS. Vinte e quatro h após o desafio os animais foram colocados no aparelho de placa quente (LE-7406 *hot plate test*), sendo registrada a latência, que é o tempo compreendido entre a colocação do animal na placa pré-aquecida e a tentativa do mesmo em saltar ou lambe uma das patas. Os animais permaneceram na placa por um tempo máximo de 30 segundos, a fim de se evitar dano tecidual (NAIDU et al., 2010).

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

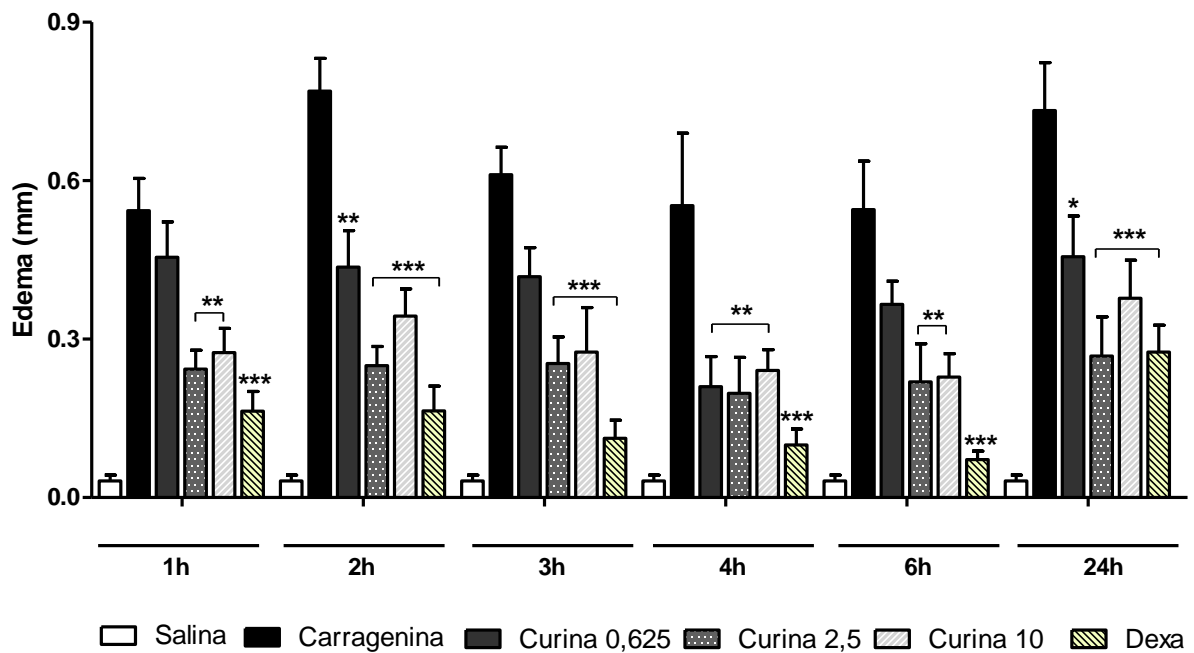
4.1 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O gráfico 1 mostra os resultados obtidos nos grupos de animais tratados oralmente com a curina (0,625, 2,5 ou 10 mg/kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico carragenina (500 µg/pata) e pode-se observar que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) do edema de pata quando comparado o grupo controle positivo (carragenina). Na primeira hora após o desafio com a carragenina, as doses de 2,5 mg/kg e 10 mg/kg de curina foram capazes de reduzir em 55,2% e 49,5 % o edema respectivamente, entretanto a dose de 0,625 mg/kg não foi efetiva em diminuir o edema de pata.

Na segunda hora após o desafio as doses de 0,625, 2,5 e 10 mg/kg reduziram significativamente ($p < 0,05$) o edema em 43,3%, 67,5 % e 55,4 % respectivamente, na terceira hora as doses de 2,5 e 10 mg/kg reduziram o edema em 55,8 % e 44,2 %, respectivamente e na quarta hora houve inibição do edema de 62 % 64,3 % e 56,4 % para as três doses (0,625, 2,5 e 10 mg/kg respectivamente), enquanto na sexta hora a inibição foi de 59,8 % e 58,1 % para 2,5 e 10 mg/kg respectivamente. No tempo de 24 horas a inibição foi de 37,8% para a dose de 0,625 mg/kg, 63,5% para a de 2,5 mg/kg e 48,5 para a de 10 mg/kg. A dexametasona (2,0 mg/kg), anti-inflamatório esteroide utilizado como droga padrão, reduziu quase que totalmente o edema induzido pela carragenina nas 6 primeiras horas de observação (70, 78,7, 81,6, 82, 86,9 % e 62,4 %.para os tempos de 1, 2, 3, 4 e 6 horas respectivamente). O grupo controle negativo (salina), não apresentou edema de pata demonstrando que o experimento funcionou de forma apropriada.

Esse resultado nos possibilitou escolher, para as futuras análises, a dose de 2,5 mg/kg devido ter sido a menor dose de curina que apresentou efeito significativo na diminuição do edema de pata de forma sistemática nos experimentos de edema induzido por carragenina.

Gráfico 1 - Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

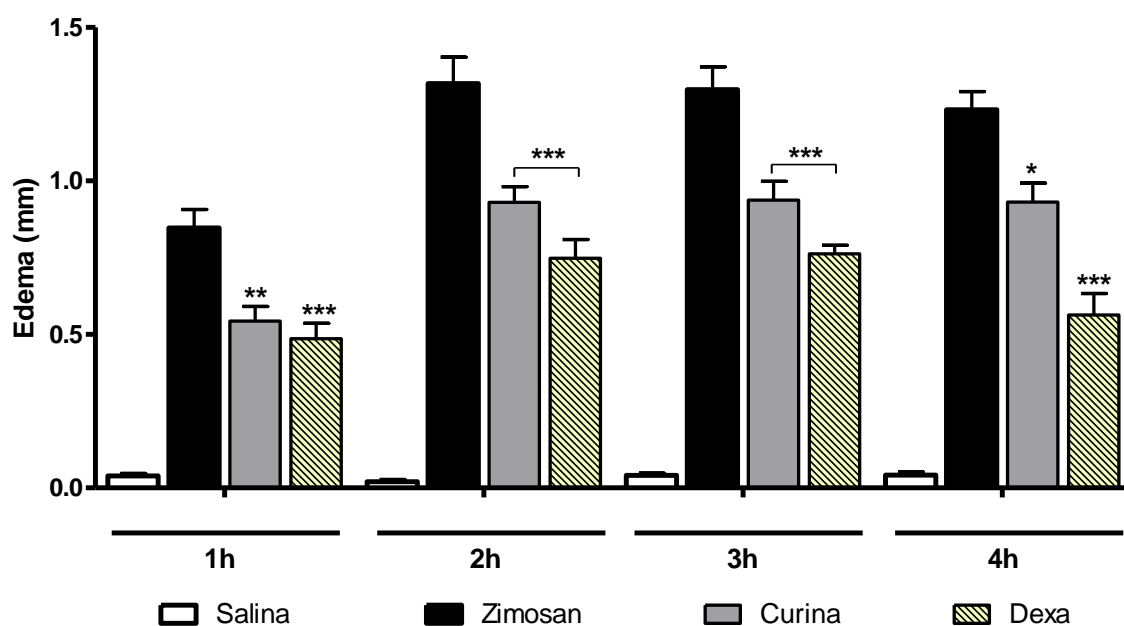


Camundongos Swiss (n=6) foram tratados com a curina nas doses indicadas, dexametasona (dexta), ou veículo (carragenina) e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de carragenina (500 µg/pata) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (salina) recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a administração da carragenina. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (n=6). * P < 0,05 , ** P < 0,01 e *** p < 0,001 quando comparados ao grupo controle positivo(carragenina). ANOVA “one-way” seguido do teste de tukey.

4.2 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ZIMOSAN

O tratamento oral dos animais com a curina (2,5 mg/kg) 1 h antes do desafio com o agente flogístico zimosan (200µg/pata), foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05-0,001$) a formação do edema de pata induzido por zimosan. Na primeira hora após a injeção do zimosan, a curina foi capaz de reduzir o edema em 35,9 % sendo esta a inibição máxima obtida neste modelo. Na segunda hora a redução foi de 29,3 % e na terceira e quarta horas a inibição do edema foi de 27,8 e 24,4 %, respectivamente. Foi possível ainda observar que a dexametasona (2,0 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05-0,001$) o edema de pata em 42,7 %, 43,2 %, 41,2 % e 54,3 % nos tempos de 1,2,3 e 4 horas respectivamente.

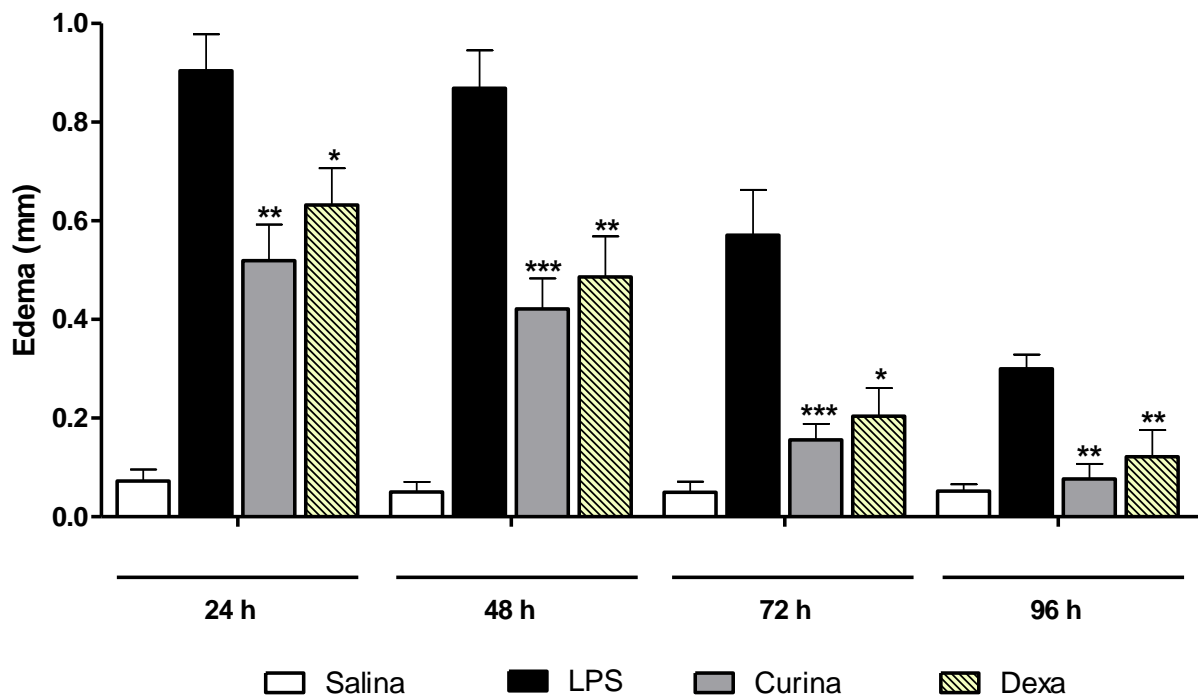
Gráfico 2- Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido pelo zimosan



Camundongos Swiss foram tratados com a curina na dose DE 2,5 mg/kg, dexametasona (dexa), ou veículo (zimosan) e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de zimosan (500 µg/pata) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (salina) recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da zimosan. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=6). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao controle positivo(zimosan). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey.

4.3 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O gráfico 3 mostra que a curina administrada, por via oral, 1 hora antes do desafio com lipopolissacarídeo (LPS) foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,01-0,001$) o edema de pata causado pelo LPS (25 µg/pata) quando comparado com o grupo controle positivo (LPS) nos diferentes tempos de observação. Essa inibição ocorreu de forma semelhante àquela observada com a dexametasona. A administração intraplantar com LPS induziu o edema de pata em todos os tempos observados (24-96 h), com efeito máximo entre 24 e 48h. Vinte e quatro horas após a injeção do LPS, o tratamento com a curina (2,5 mg/kg) foi capaz de reduzir o edema em 42,6 %. Efeito esse também observado nos demais tempos (48, 72 e 96 h) com inibições de 51,5, 72,7 e 72,5 %, respectivamente. O tratamento com a dexametasona 1 h antes do desafio com LPS, como esperado, reduziu o edema de pata em 30,1 %, 44, 50,3 e 71,8 % nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente.

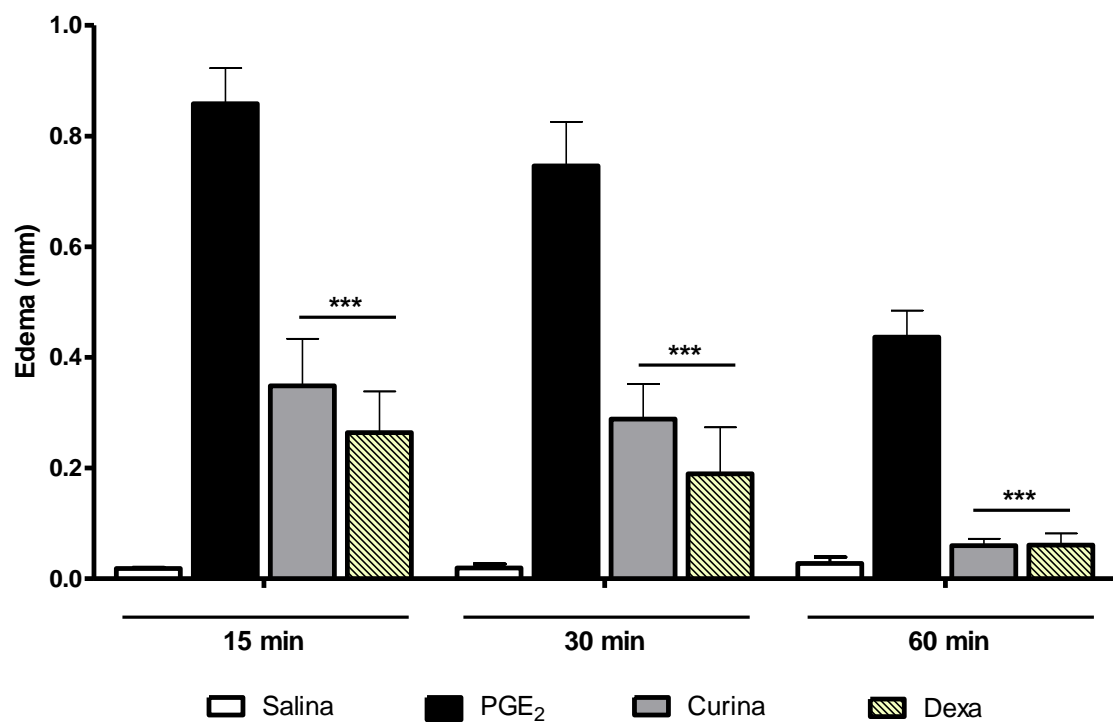
Gráfico 3: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por LPS.

Camundongos Swiss (n=6) foram tratados com a curina, dexametasona, ou veículo (não tratados - LPS) 1 hora antes da injeção intraplantar de LPS (25 µg/pata) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (salina) recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda, 24, 48, 72 e 96 horas após a administração do LPS. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). ANOVA "one-way" seguido do teste de *tukey*.

4.4 EFEITO DA CURINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂)

O tratamento oral com a curina 1 h antes do desafio com PGE₂, diminuiu significativamente ($P < 0,001$) o edema de pata causado pela PGE₂ (5 nmol/pata). Nos primeiros 15 min após a injeção da PGE₂, a curina reduziu em 59,4% o edema quando comparado com os animais do grupo controle positivo (PGE₂). Comportamento semelhante foi observado nos tempos de 30 e 60 min, com uma redução de 61,3% e 86,3%, respectivamente. O tratamento com a dexametasona (2,0 mg/kg) reduziu significativamente ($P < 0,001$) o edema de pata induzido pela PGE₂ em todos os tempos (15, 30 e 60 min) de observação em 69,3 % , 74,6 % e 86,1% respectivamente. A inibição do edema observada pela curina foi semelhante estatisticamente à da dexametasona.

Gráfico 4: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por PGE₂.

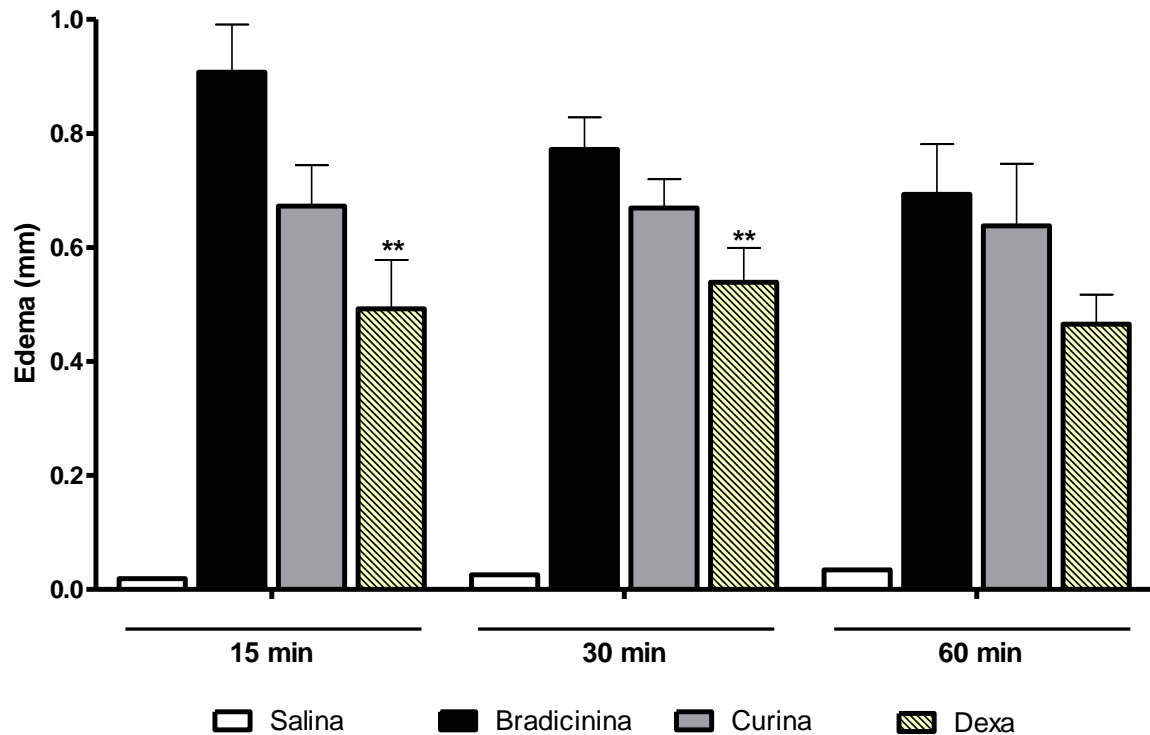


Camundongos Swiss (n=6) foram tratados com a curina, dexametasona, ou veículo (PGE₂) 1 h antes do desafio com uma injeção intraplantar de PGE₂ (5 nmol/pata) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (salina) recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda, 15, 30 e 60 min após a administração da PGE₂. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo(PGE₂). ANOVA “one-way” seguido do teste de tukey.

4.5 EFEITO DA CURINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA

O gráfico 5 mostra que o tratamento oral com a curina 1 h antes do desafio com bradicinina (3 nmol/pata) não foi capaz de diminuir significativamente o edema de pata induzido por bradicinina. Nos primeiros 15 a 30 minutos após a injeção da bradicinina, apenas a dexametasona foi capaz de inibir significativamente ($P < 0,05$) o edema em 45,7% e 30,2% respectivamente quando comparado ao grupo controle positivo (Bradicinina). Entretanto, no tempo de 60 min após o desafio com a bradicinina nenhum dos tratamentos foi capaz de inibir a formação do edema de pata.

Gráfico 5: Efeito do tratamento oral com a curina sobre o edema de pata induzido por Bradicinina.



Camundongos Swiss (n=6) foram tratados com a curina, dexametasona (dexa), ou veículo (Bradicinina) 1 h antes do desafio com uma injeção intraplantar de bradicinina (3 nmol/pata) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle negativo (salina) recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda, 15, 30 e 60 min após a administração da bradicinina. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ quando comparados ao grupo controle positivo (Bradicinina). ANOVA "one-way" seguido do teste de

4.6 EFEITO DA CURINA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CÉLULAS

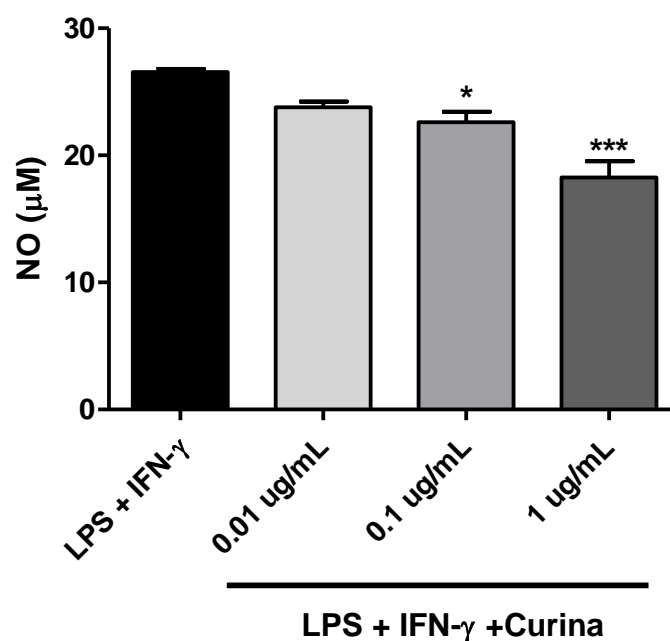
J774 A.1

Previamente, em análise da citotoxicidade em células J774 A.1, a concentração citotóxica 50% (CC50) foi determinada em análise de regressão não-linear ($R^2=0,9542$), e a curina apresentou CC50 de 180,98 $\mu\text{g/mL}$.

O gráfico 6 mostra que o tratamento com a curina, nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ reduziram de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) a concentração de nitrito presente no sobrenadante dessas culturas de células estimuladas com LPS+IFN- γ , quando comparadas ao controle positivo (LPS+IFN- γ). Entretanto, a curina na concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ não produziu efeito significativo na produção de óxido nítrico quando comparado ao controle positivo (LPS+IFN- γ).

O percentual de inibição obtida pelas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ da curina foi 14,8% e 31,2 % respectivamente.

Gráfico 6. Efeito da curina na produção de nitrito por células da linhagem J774 A.1.

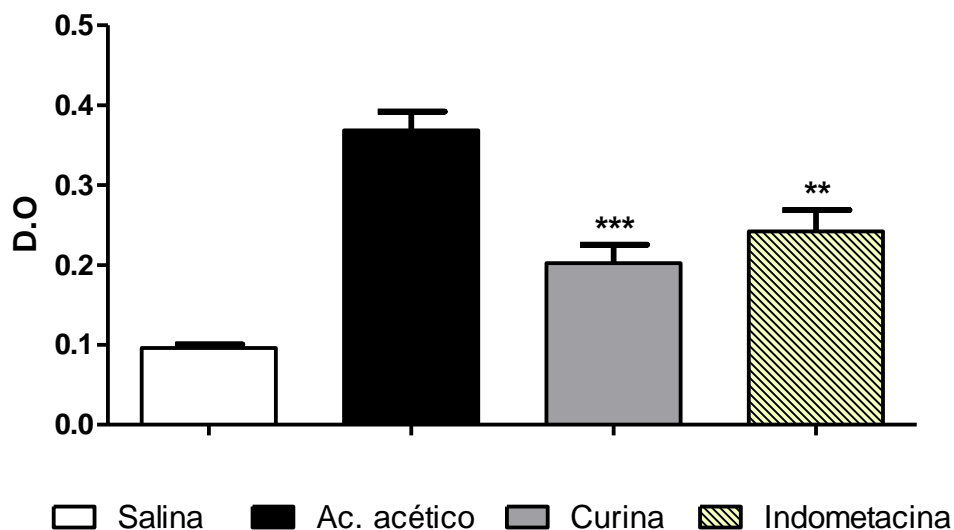


Células J774 A.1 foram cultivadas por 48 horas em meio RPMI completo na presença de estímulos (100 U/mL de IFN- γ e 10 U/mL de LPS) e de diferentes concentrações da curina. A produção de NO foi determinada pelo método de Griess. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA *one-way* e pós teste de tukey e * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados controle positivo (LPS+IFN- γ).

4.7 EFEITO DA CURINA NA PERMEABILIDADE VASCULAR INDUZIDA PELO ÁCIDO ACÉTICO

Como pode ser observado no gráfico 7 o tratamento oral dos animais com a curina (2,5 mg/kg) diminuiu, significativamente ($p < 0,001$), o extravasamento de líquido para o peritônio quando comparado com os animais do grupo controle positivo (Ac. Acético). Esse efeito inibitório foi de 46,2% para a curina e para a droga padrão indometacina foi de 38,8 % ($p < 0,01$).

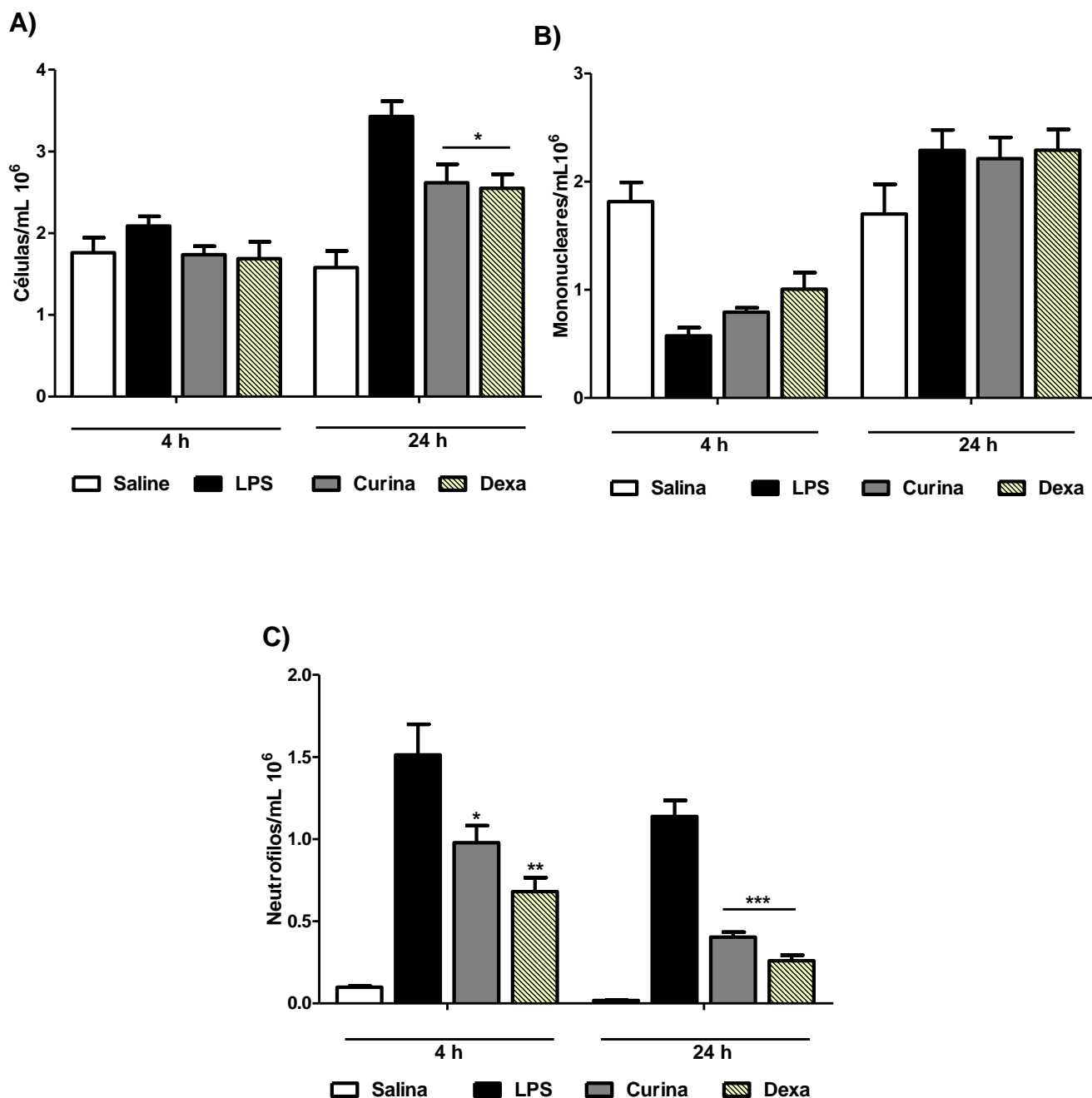
Gráfico 7: Efeito do tratamento oral com a curina sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético.



Camundongos Swiss ($n=6$) foram tratados com a curina, indometacina ou veículo (Ac. Acético) 1 h antes de uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6% em salina). O efeito foi avaliado pelo extravasamento do corante azul de Evans para a cavidade peritoneal dos camundongos, 1 hora após o desafio com ácido acético. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (Ác. Acético). ANOVA “one-way” seguido do teste de tukey.

4.8 EFEITO DA CURINA NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE PLEURAL INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

No gráfico 8 A observa-se que o tratamento com a curina ou dexametasona não interferiu no número total de células na cavidade pleural no tempo de 4 h após o desafio com LPS. Entretanto no tempo de 24h foi possível observar diminuição significativa ($p < 0,05$) nesta população de células tanto no tratamento com curina ou dexametasona (dexa) quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). Essa diminuição foi de 23,7% e 25,6% respectivamente. Como pode ser observado no gráfico 8B o desafio com LPS na 4 hora demonstrou diminuição (68,3%) desta população celular bem como com os tratamentos (curina ou dexametasona). Entretanto, no tempo de 24h o número de células mononucleares apresentam-se de forma semelhante nos quatro grupos de animais (salina, LPS, curina e dexa). No gráfico 8C, a curina reduziu de forma tempo-dependente o número de neutrófilos na cavidade pleural quando comparados ao grupo controle positivo (LPS), essa inibição foi de 35 % em 4 h e 64 % em 24 h. A dexametasona causou uma inibição de neutrófilos na cavidade pleural de 30 % e 77 % nos tempos de 4 e 24 h, respectivamente (gráfico 8 C). Esses dados demonstram que a curina possui efeito inibitório sobre o processo de migração de neutrófilos induzido por LPS.

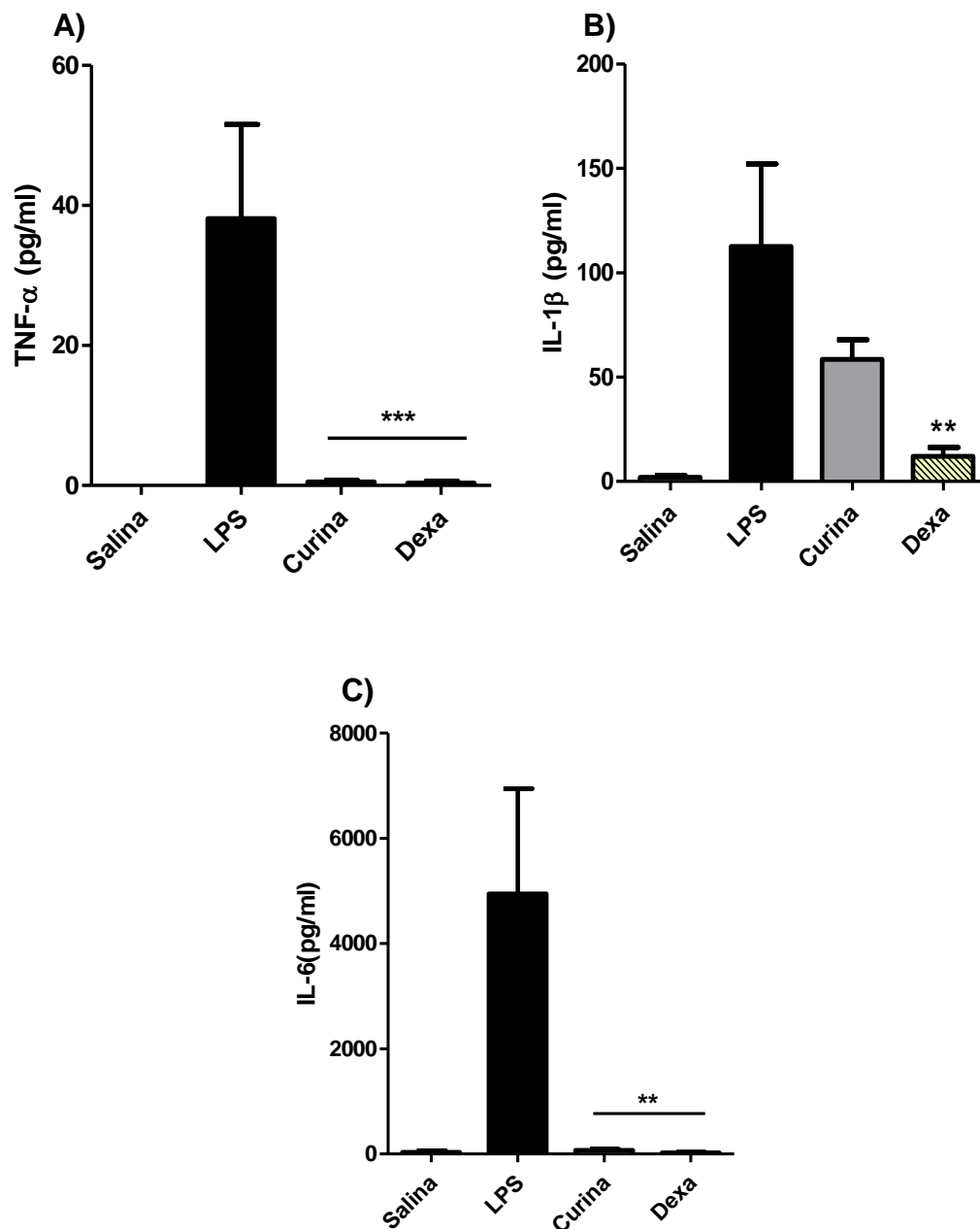
Gráfico 8. Efeito da curina sobre a migração de células para a cavidade pleural induzida por LPS.

Camundongos C57BL/6 (n=6) foram tratados com a curina, dexametasona (dexa), ou veículo (LPS) 1 h antes da injeção intratorácica de LPS (250 ng/cavidade). O número de células totais (A), mononucleares (B) e polimorfonucleares (C) no lavado pleural foram avaliados 4 e 24 horas após o desafio com LPS. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey.

4.9 EFEITO DA CURINA NOS NÍVEIS DE CITOCINAS TNF- α , IL-1 β E IL-6 NO LAVADO PLEURAL

No gráfico 9 observa-se que a administração intrapleural de LPS (250 ng/cavidade) aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 após 4 horas quando comparado ao grupo controle negativo (salina), (gráficos 9 A, B, C). O tratamento dos camundongos com a curina reduziu significativamente ($p < 0,001$) os níveis de TNF- α e IL-6 (Graf.8 A e C) quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). Porém, a curina não foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β (Graf. 8 B). O tratamento dos camundongos com a dexametasona reduziu, como era de se esperar, significativamente ($p < 0,001$) os níveis das três citocinas quantificadas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) quando comparadas aos grupos controle positivo (LPS) (graf. 8A,B e C).

Gráfico 9. Efeito do tratamento com curina nos níveis das citocinas TNF- α , IL1- β e IL-6 no lavado pleural em modelo de pleurisia induzida por LPS.

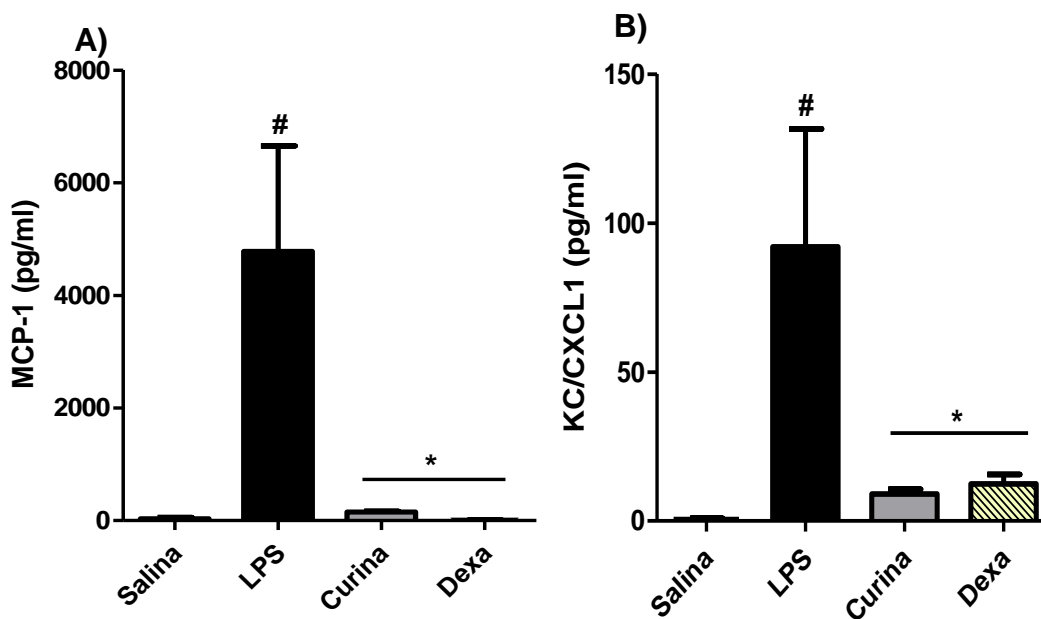


Camundongos C57BL/6 ($n=6$) foram tratados com a curina, dexametasona (Dexta), ou veículo (LPS) 1 h antes da injeção intratorácica de LPS (250 ng/cavidade). Quatro horas após o desafio com LPS o sobrenadante foi coletado e os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) foram mensurados. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey.

4.10 EFEITO DA CURINA SOBRE OS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS MCP-1 E KC/CXCL1 DO LAVADO PLEURAL

A administração intrapleural de LPS (250 ng/cavidade), aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis das quimiocinas MCP-1 e KC/CXCL1 quando comparado ao grupo controle negativo (salina) (gráficos 10 A, B). O tratamento dos camundongos com a curina diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de MCP-1 (Graf. 9A) quando comparados ao grupo controle positivo (LPS), o que também pode ser observado com os níveis de KC/CXCL1 (Graf.9B). Além disso, pode-se observar que o tratamento do camundongos com a dexametasona, reduziu significativamente ($p < 0,001$) os níveis de citocinas, MCP-1 e KC/CXCL1 quando comparados ao grupo controle positivo (LPS).

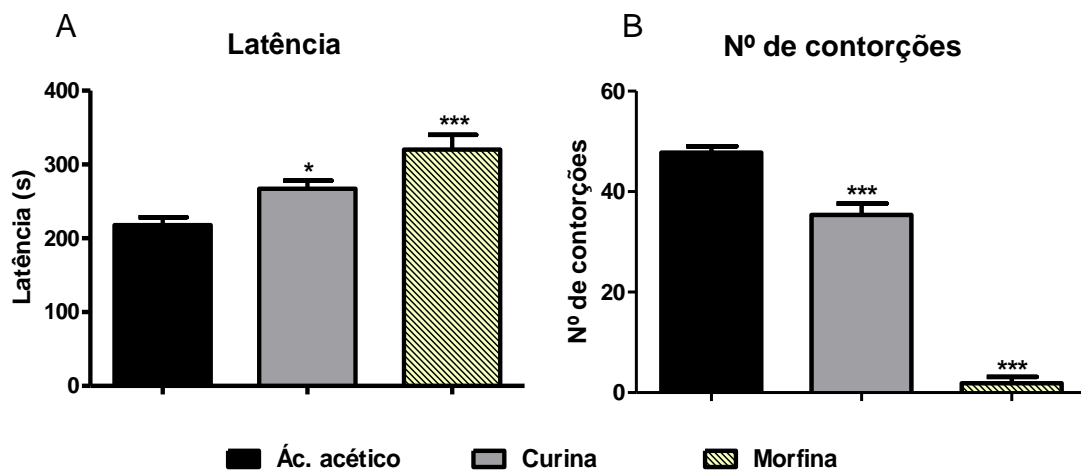
Gráfico 10. Efeito do tratamento com curina nos níveis das citocinas MCP-1 e KC/CXCL1 no lavado pleural em modelo de pleurisia induzida por LPS.



4.11 EFEITO DA CURINA NAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO

Os gráficos 11A e 11B demonstram que o tratamento oral com a curina (1 h antes do desafio com o ácido acético 1%.) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) no aumento da latência, e diminuição significativa ($p < 0,001$) no número de contorções abdominais em relação ao grupo controle positivo (Ac. Acético). Como observado no gráfico 11A a curina aumentou em 17% a latência no surgimento das contorções abdominais e diminuiu em 26% o numero de contorções abdominais em relação ao grupo controle positivo (Ac. Acético). A droga padrão (morfina) causou um aumento de 47% na latência (gráfico 11A) e redução de 96% (gráfico 11B) no número de contorções abominais após a administração do ácido acético quando comparados ao grupo controle positivo (Ac. Acético).

Gráfico 11. Efeito do tratamento com curina sobre a latência e numero de contorções abdominais induzidos por ácido acético.

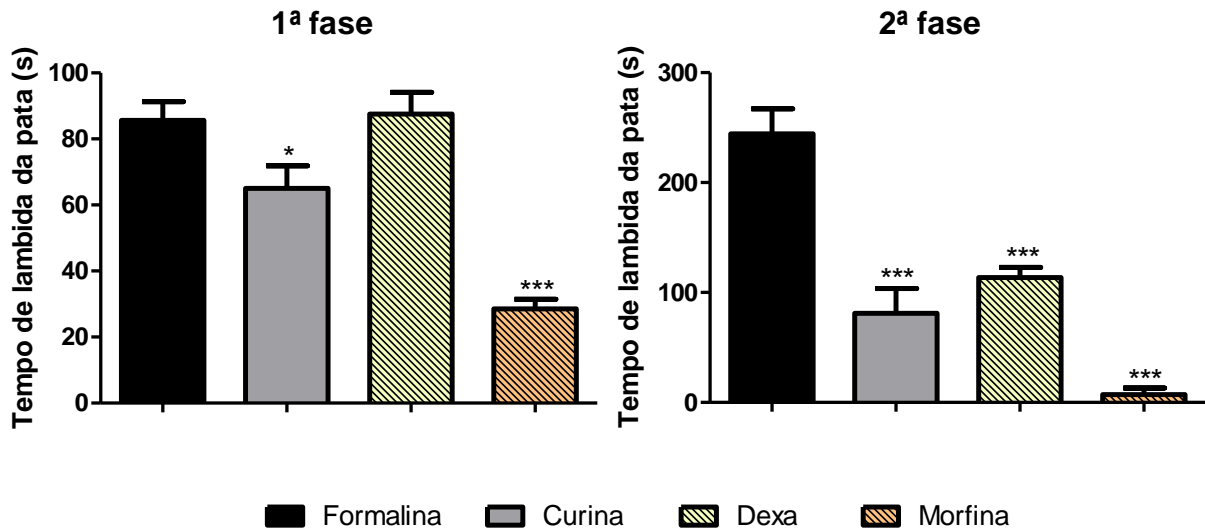


Camundongos Swiss ($n=8$) foram tratados com a curina, morfina, ou veículo (Ac. acético) 1 h antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 1%. Posteriormente foram avaliadas a latência (A) e número de contorções (B). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média ($n=8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (Ac. acético). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey ou teste t de *student*.

4.12 EFEITO DA CURINA NA ATIVIDADE NOCICEPTIVA INDUZIDA PELA FORMALINA

A primeira fase do teste da formalina correspondente aos cinco primeiros minutos após a administração intraplantar da solução de formalina. Como é possível observar Gráfico 12A os animais tratados com curina apresentaram redução significativamente ($p < 0,05$) no tempo de lambida da pata (24%), em relação ao grupo controle positivo (formalina). Na segunda fase do teste da formalina (15-30 min após a administração) observou-se também inibição significativa ($p < 0,001$) da curina nesse comportamento, a inibição foi de 67% quando comparado ao grupo controle positivo (formalina). A dexametasona não foi capaz de inibir a 1ª fase do teste, entretanto causou uma inibição de 54 % quando comparados ao grupo controle positivo na segunda fase. Já a morfina inibiu as duas fases do teste, com redução de 67 % (gráfico 10A) e 97% (gráfico 10B) respectivamente quando comparados ao grupo controle positivo (formalina).

Gráfico 12. Efeito do tratamento com curina sobre os estímulos dolorosos induzidos pela formalina.

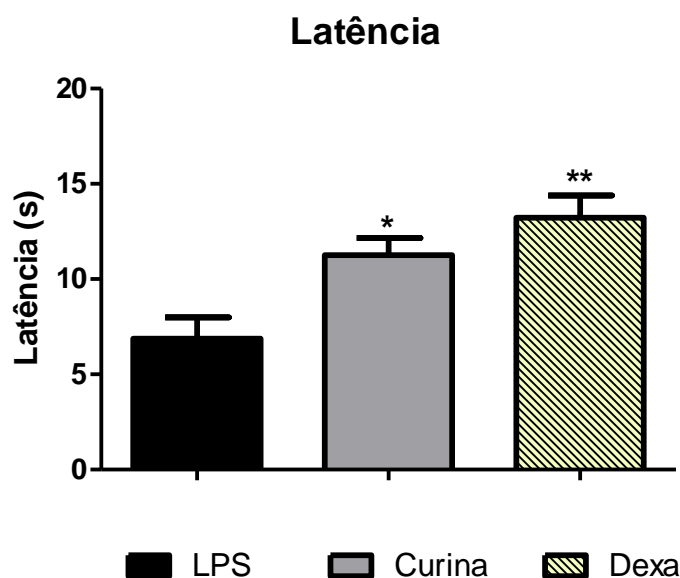


Camundongos Swiss (n=8) foram tratados com a curina, dexametasona, morfina, ou veículo (formalina) e após 1 h, receberam a injeção intraplantar de formalina. Posteriormente foram avaliadas a atividade antinociceptiva na 1ª fase (A) 2ª fase (B). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (Formalina). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey para dados.

4.13 EFEITO DA CURINA NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR LPS

A injeção intraplantar de LPS induz sensibilização central, que reduz o limiar de nocicepção quando testado na placa de aquecimento (Kanaan et al., 1997). O gráfico 13 demonstra que o tratamento oral com a curina aumentou significativamente ($p < 0,05$) a latência do reflexo de salto ao estímulo térmico, quando comparado ao grupo controle positivo (LPS). O tratamento com a curina aumentou a latência em 63,6% e a dexametasona em 92% quando comparados ao grupo controle positivo (LPS).

Gráfico 13. Efeito da curina na hiperalgesia induzida por LPS.



Camundongos Swiss ($n=8$) foram desafiados pela administração intraplantar de LPS e 23h após foram tratados com a curina, dexametasona (Dexa), ou veículo (LPS). A latência foi avaliada 24 h após o desafio com LPS. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo controle positivo (LPS). ANOVA "one-way" seguido do teste de tukey.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais pela população tem sido um importante recurso terapêutico no tratamento de diversas patologias e sua aceitação vem crescendo junto à comunidade científica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (KINGHORN, 2001).

A família das plantas floríferas Menispermaceae é, em sua maioria, trepadeira e encontra-se nos trópicos. Embora o número de espécies desta família não seja expressivo em comparação com o de outras famílias de plantas, as mesmas apresentam grande importância por apresentarem componentes biologicamente ativos e serem usadas na medicina tradicional em vários países. Além disso, diversas espécies da família Menispermaceae têm sido cientificamente identificadas por suas atividades farmacológicas, incluindo a atividade anti-inflamatória (JAHAN *et al.*, 2010).

Estudos recentes com a planta *Chondodendrom platyphyllum* (Menispermaceae) demonstram que a fração de alcaloides totais e o alcaloide isolado curina possuem atividade antialérgica com possível efeito anti-inflamatória (RIBEIRO-FILHO, 2011).

Baseados nas informações acima investigamos o possível efeito anti-inflamatório do alcaloide bisbenzilisquinolinico, curina, em modelos experimentais de inflamação aguda, tais como indução de edema de pata por diferentes agentes flogísticos, permeabilidade vascular e pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e produção de óxido nítrico (NO) e nocicepção pelos modelos experimentais de testes das contorções abdominais pelo ácido acético, formalina e hiperalgesia induzida por LPS.

A inflamação é uma resposta benéfica e fisiológica do hospedeiro contra agentes estranhos ou lesão tecidual, que leva ao final do processo a restauração da estrutura e função do tecido. No entanto, a inflamação exacerbada ou prolongada pode deixar de ser um evento benéfico e contribuir para a patogênese de muitas

doenças inclusive as autoimunes (TRACEY, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; CASTELLHEIM *et al.*, 2009).

O processo inflamatório é dividido didaticamente em fenômenos agudos e crônicos. A inflamação aguda é uma reação da microcirculação, que se caracteriza por movimentos de proteínas séricas e leucócitos (principalmente neutrófilos) do sangue para o tecido extravascular. Este movimento é regulado pela liberação sequencial de mediadores vasoativos e quimiotáticos, que contribuem para os sinais cardinais clássicos da inflamação (dor, calo, rubor e edema ou tumor). A vasodilatação local aumenta o fluxo sanguíneo regional para a área inflamada e, juntamente com um aumento na permeabilidade microvascular, resulta na perda de líquidos e proteínas do plasma para os tecidos (FEGHALI e WRIGHT, 1997; ALLER *et al.*, 2006).

A administração subcutânea de agentes flogísticos como a carragenina, o zimosan e o lipopolissacarídeo de parede de bactérias Gram-negativas (LPS) na região subplantar das patas traseiras de camundongos provoca uma reação inflamatória aguda localizada levando ao inchaço das patas pelo imediato extravasamento de líquido e proteínas e posterior migração de leucócitos para o tecido inflamado, Estes modelos experimentais têm sido considerados eficazes na identificação de novos compostos com ação anti-inflamatória (KANAAAN *et al.*, 1997; NIEDERBERGER *et al.*, 2001; POSADAS *et al.*, 2004; NAIDU *et al.*, 2010).

O presente trabalho demonstrou que a curina, um alcaloide isolado das cascas de *Chondodendrom platyphyllum*, quando administrada por via oral, reduziu o edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina, zimosan e LPS. O processo inflamatório induzido por esses agentes apresentam características semelhantes tais como extravasamento protéico, vasodilatação e acúmulo de leucócitos, porém os mediadores envolvidos são diferentes em algumas etapas do processo inflamatório (FANTUZZI *et al.*, 1997; POSADAS *et al.*, 2004; NAIDU *et al.*, 2010).

A carragenina é um agente flogístico que causa uma reação inflamatória reprodutível e facilmente mensurável, fatos que tem contribuindo para mantê-la como uma das principais ferramenta farmacológica para experimentos que envolvem

a análise de processos inflamatórios agudos (LAZZARINI *et al.*, 2003). Neste modelo a carragenina promove um aumento imediato da permeabilidade vascular, induzida por mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas (PGs), bradicinina, histamina, moléculas do sistema complemento, e óxido nítrico (NO) (0-6h). A permeabilidade vascular ocorre simultaneamente com o recrutamento de neutrófilos (6-24 h) para o local da inflamação (POSADAS *et al.*, 2004).

Diferentes doses da curina (0,625, 2,5 e 10 mg/kg) foram testadas no modelo de edema de pata induzido por carragenina e, as doses de 2,5 e 10 mg/kg reduziram o edema de pata de forma semelhantes sugerindo efeito anti-inflamatório deste alcaloide. Estes dados corroboram como os dos estudos realizados por Ribeiro-filho. (2011) onde a dose de 2,5 mg/kg da curina foi tão eficaz quanto a de 10 mg/kg em modelos experimentais de alergia. Portanto, a dose de 2,5 mg/kg de curina foi testada nos demais experimentos de inflamação e nocicepção com o objetivo de respaldar cientificamente seu efeito nesses processos de doença.

O zimosan é uma fração insolúvel da parede celular de levedura e, entre diversas outras ações o zimosan induz a degranulação de mastócitos, a ativação macrófagos e do sistema complemento, do fator de ativação plaquetária (PAF) além de liberação de PGs e NO (RIDGER *et al.*, 1997). No entanto em ambos os modelos de inflamação aguda originada por carragenina e por zimosan as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 aparecem no local inflamado causando ativação das células endoteliais e conseqüentemente migração de neutrófilos (FANTUZZI *et al.*, 1997; POSADAS *et al.*, 2004).

A curina também foi responsável pela redução do edema de pata induzido pelo zimosan confirmando o potencial anti-inflamatório observado no modelo de inflamação induzido por carragenina. Este resultado associado ao descrito acima sugerem que a curina apresenta seu efeito sobre mediadores da inflamação tais como aminas vasoativas e /ou mediadores lipídicos, moléculas inflamatórias tais como citocinas e NO.

Vários estudos com alcaloides têm demonstrado que estas moléculas possuem importantes ações anti-inflamatórias (HIKINO *et al.*, 1980; SEOW *et al.*, 1989; TEH *et al.*, 1990; WONG *et al.*, 1992; CHUNG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011;

DA SILVA *et al.*, 2012). Como exemplos desses estudos os alcaloides bisbenzilisquinolínicos berbamina, cefarantina e tetrandrina obtidos de plantas da família Menispermaceae inibiram as funções de neutrófilos e monócitos, incluindo locomoção, aderência e geração de ions superóxido. Em adição, a tetrandrina inibiu a proliferação de linfócitos induzida por mitógeno, liberação de histamina pelos mastócitos, secreção de IL-1 por monócitos humanos e a ação do PAF em plaquetas (SEOW *et al.*, 1986; SEOW *et al.*, 1988; TEH *et al.*, 1990). Posteriormente, Wong *et al.* (1992) demonstraram que tanto tetrandrina como berbamina diminuíram os níveis de IL-1 β , TNF- α e PAF em modelo de inflamação aguda em ratos e ambos os alcaloide foram capazes de reduzir o infiltrado celular (polimorfonucleares) induzido por carragenina. Estes estudos demonstraram que esses alcaloides bisbenzilisquinolínicos apresentam efeito anti-inflamatório via modulação de moléculas e células inflamatórias.

Ivanovska *et al.* (1996 e 1999) e Kupeli *et al.* (2002) demonstraram que as frações de alcaloides e o alcaloide berberina (alcaloide isoquinolínico) obtidos de raízes de *Berberis vulgaris* e isopirutalina e isotalictrina (alcaloides bisbenzilisquinolínicos) respectivamente, inibiram a formação do edema de pata em modelos de inflamação induzidos por carragenina e zimosan e a atividade do sistema complemento. Outros alcaloides berbamina, palmatina e columbamina (alcaloides bisbenzilisquinolínicos) também apresentaram efeitos semelhantes na formação do edema de pata induzida pela serotonina tanto em aplicações orais como tópicas (KUPELI *et al.*, 2002). Esses trabalhos sugerem que alcaloides, em geral, interferem no curso do processo inflamatório via inibição de efeito e/ou produção de moléculas inflamatórias.

O Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba vem estudando sistematicamente a planta *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) e seu alcaloide warifteina (alcaloide bisbenzilisquinolínico) em diferentes modelos de inflamação aguda e crônica e tem demonstrado que a warifteina inibiu o recrutamento de eosinófilos, a produção de eotaxina e cistenil leucotrienos na cavidade pleural, e no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovalalbumina (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006). Esses dados demonstram claramente o papel imunomodulador da warifteina nos processos inflamatórios mediados por alérgenos.

A inflamação induzida por LPS é um modelo experimental útil para identificar moléculas anti-inflamatórias moduladoras de citocinas (VAJJA *et al.*, 2004), isto porque o LPS sendo um dos principais fatores de bactérias Gram-negativas responsável pelas manifestações tóxicas nas infecções por este tipo de microrganismo liga-se a receptores do tipo Toll (TLR) na membrana de células da inflamação tais como monócitos e neutrófilos e induz a produção de citocinas tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC/CXCL1, MCP-1 (AKIRA e TAKEDA, 2004).

A curina foi capaz de inibir a formação do edema de pata induzido por LPS sugerindo, portanto, que este alcaloide também esteja atuando em vias bioquímicas intracelulares que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Com base nos resultados acima discutidos sugerimos que a curina esteja interferindo, de alguma forma, na produção e/ou ação de mediadores inflamatórios como PGs, NO e bradicinina e ainda inibição na produção de citocinas inflamatórias.

Com o objetivo de entender o(s) possível (eis) mecanismo(s) que envolve o efeito anti-inflamatório da curina testamos este alcaloide nos modelos experimentais de inflamação induzidos por mediadores vasoativos como a PGE₂ e bradicinina.

A PGE₂ induz uma resposta inflamatória com extravasamento de plasma para o tecido inflamado, contração do músculo liso favorecendo a passagem do plasma bem como desenvolvimento da dor e febre (DEWITT, 1991). Em geral, as PGs são produzidas por enzimas denominadas de ciclooxigenases (COXs) e, três isoformas da enzima COX, a COX-1, COX-2 e COX-3, foram identificadas, sendo a COX-1 constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e a COX-2 induzida por estímulos inflamatórios, incluindo, zimosan, carragenina, LPS e citocinas como a IL-1 β e o TNF- α (HUANG *et al.*, 2000; POSADAS *et al.*, 2004; MITCHELL e WARNER, 2006; NAOI *et al.*, 2006; ALVAREZ *et al.*, 2009; SCHLACHETZKI *et al.*, 2010).

Outro mediador inflamatório importante é a bradicinina. Esta molécula é formada a partir do precursor cininogênio que, sob ação de enzimas plasmáticas e teciduais denominadas de caliceínas produzem a bradicinina (MOREAU *et al.*, 2005). A ação da bradicinina é realizada via a ativação dos receptores B1 e B2 presentes nas células endoteliais, promovendo vasodilatação e consequente extravasamento de plasma para o tecido inflamado, produção de citocinas pró-

inflamatórias via ativação de mastócitos, fibroblastos e macrófagos e, em associação à estes efeitos, a bradicinina também está envolvida na nocicepção (BHOOLA *et al.*, 1992; MARCEAU e REGOLI, 2004; PIETROVSKI *et al.*, 2011).

Nesse estudo foi observado que a curina inibiu o efeito da PGE₂ na formação do edema, entretanto, na dose em estudo, não foi possível observar este efeito quando se utilizou a bradicinina como agente flogístico. Esses resultados sugerem que a curina tem seu efeito anti-inflamatório em parte sob a ação da PGE₂.

A inibição na produção de PGE₂ tem sido demonstrada em modelos inflamatórios utilizando alcaloides isoquinolínicos e bisbenzilisquinolínicos. Tetrândrina e berbamina causaram inibição significativa e dose-dependente na produção da PGE₂ em monócitos humanos (TEH *et al.*, 1990). Esse efeito inibitório foi associado à capacidade desses alcaloides em diminuir a expressão da COX-2 e consequentemente diminuição na produção de PGE₂ (WU e NG, 2007). Diferentemente da curina, o tratamento com tetrândrina e berbamina demonstrou inibir o efeito da bradicinina. Essa aparente contradição de resultados entre estes alcaloides tetrândrina e a berbamina versus curina pode estar relacionada com o modelo experimental e as doses utilizadas. As doses utilizadas da tetrândrina e da berbamina foram aproximadamente 12 vezes maiores que à da curina e o tratamento com estes alcaloides foi de forma contínua por nove dias (WONG *et al.*, 1992).

A vasodilatação induzida por PGs e bradicinina está relacionada a produção de NO (WOTHERSPOON *et al.*, 2005). Níveis elevados de NO são produzidos por macrófagos ativados por citocinas como o interferon gama (IFN- γ) e LPS pela indução da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e têm sido indicadores de inflamação e endotoxemia (KRONCKE *et al.*, 1997; LIN, C. F. *et al.*, 2008). Em muitas condições inflamatórias, a inibição da iNOS tem se mostrada benéfica, devido a redução na produção de NO e a diminuição da geração de peroxinitrito. O NO produzido por macrófagos ativados é capaz de lesar hepatócitos, células das ilhotas pancreáticas e linfócitos (HIBBS *et al.*, 1984; DRAPIER e HIBBS, 1986; 1988). O mecanismo da lesão tecidual, resultante da produção excessiva de NO, inclui mecanismos de liberação de ferro intracelular, inibição da função mitocondrial e diminuição da síntese de DNA (DRAPIER e HIBBS, 1988; ALLER *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o NO promove a reação inflamatória por aumentar a síntese e liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e derivados do ácido araquidônico incluindo PGE₂ (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1995; MOLLACE *et al.*, 2005).

A curina notavelmente inibiu a produção de NO em culturas de células linhagem macrófágica J774 A.1 estimuladas por IFN- γ e LPS sendo esta inibição não relacionada a morte celular uma vez que as células nas culturas estavam aproximadamente 100% viáveis.

Alguns estudos relataram a capacidade de alcaloides e extratos ricos nesses constituintes em reduzirem a produção de NO. Estudos demonstraram que a tetrandrina e a cefarantina inibiram a produção de NO induzido por LPS em culturas de macrófagos/monócitos e células mesangiais pela diminuição da atividade da iNOS (KONDO *et al.*, 1993; KUDO *et al.*, 2011; WU e NG, 2007; WU *et al.*, 2011). Em adição a berberina diminuiu a produção de NO em tecido gástrico via a inibição da expressão da iNOS promovendo portanto melhora no processo de cicatrização de úlceras (PAN *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2010).

Como já extensivamente mencionado acima o aumento na permeabilidade vascular é um dos primeiros sinais no processo inflamatório e é ocasionado por diversos mediadores produzidos no local da inflamação (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Neste sentido testamos a curina no modelo experimental de permeabilidade vascular induzida por ácido acético. A permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético induz aumento nos níveis peritoneais de PGE₂, serotonina e histamina, constituindo um modelo útil no estudo de drogas com ação anti-inflamatória periférica (KOU *et al.*, 2005).

Os resultados demonstram que a curina inibiu a permeabilidade vascular corroborando com a hipótese de que um dos mecanismos de ação da curina no processo inflamatório é em parte via a inibição da ação e/ou produção da PGE₂.

Outro evento de relevância no processo inflamatório é a migração de leucócitos do sangue para o tecido inflamado. Os neutrófilos constituem as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o tecido onde contribuem pela destruição do patógeno e pela cicatrização do tecido. Entretanto se a célula se

perpetuar no tecido poderá levar a danos teciduais como se observa nas maiorias das doenças inflamatórias crônicas como as autoimunes e asma (MEDZHITOV, 2010). O recrutamento de neutrófilo pode ser iniciado por fatores derivados do hospedeiro como os denominados de sinal de perigo como as citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas e por componentes microbianos como o LPS. O efeito do LPS é mediado principalmente pela ligação ao receptor semelhante ao toll do tipo-4 (TLR-4) (MEDZHITOV, 2010). A ativação deste receptor desencadeia diversas vias de sinalização como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*), IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*) entre outras. Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) que ao se translocar para o núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos tais como os genes de citocinas e quimiocinas importantes no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamado (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

A curina inibiu a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório no modelo experimental de pleurisia induzida por LPS sugerindo modulação na expressão de moléculas de superfície celular e/ou produção de citocinas/quimiocinas importantes para o processo de migração de leucócitos para o sítio inflamado.

A inibição da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório agudo pode ser modulada por vários alcaloides. A berberina diminuiu o processo inflamatório intestinal induzido por LPS em camundongos BALB/c com clara redução de neutrófilos via a inibição da ativação do TLR4 (LI *et al.*, 2011). Em adição, Zhao *et al.* (2010) demonstraram que o pré-tratamento de camundongos com neferina (alcaloide bisbenzilisquinolinico) diminuiu o número neutrófilos e outras células e a atividade da mieloperoxidase. Cefarantina também inibiu o acúmulo de neutrófilos induzido por LPS na cavidade pleural de camundongos com inibição na expressão do NFκB (MURAKAMI *et al.*, 2000; KUDO *et al.*, 2011).

A migração de células do sangue para o tecido inflamado é também regulada por citocinas/quimiocinas (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Várias citocinas designadas de inflamatórias estão envolvidas na fisiopatologia de uma série de doenças e complicações associadas sendo, portanto potenciais alvos terapêuticos.

Cailhier *et al.* (2006) observaram que macrófagos da cavidade pleural quando estimulados com LPS, produzem níveis elevados de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Essas citocinas são de extrema importância para o início da fase aguda da inflamação, induzindo a expressão de moléculas de adesão nos leucócito e células endoteliais, que conseqüentemente facilitam a diapedese de leucócitos, além de induzirem a produção de proteínas de fase aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2010). Evidências crescentes indicam que estas citocinas são importantes na patogênese das complicações microvasculares em pacientes com diabetes mellitus, incluindo nefropatia diabética (NAVARRO-GONZALEZ *et al.*, 2011). As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α são consideradas as principais reguladoras da inflamação em varias doenças incluindo, lúpus, artrite, diabetes (ALEXANDRAKI *et al.*, 2006; MACZYNSKA *et al.*, 2006; FELDMANN e MAINI, 2008; MORI *et al.*, 2011).

A curina foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-6, entretanto não causou alterações nos níveis de IL-1 β indicando que a redução da migração de neutrófilos ocasionada pela curina seja, em parte, pela inibição na produção TNF- α e IL-6 mas independente da IL-1 β .

Resultados semelhantes foram descritos por Zhao *et al.* (2010) e Kudo *et al.* (2011) onde o tratamento de camundongos com o neferina ou cefarantina diminuiu de forma significativa os níveis de TNF- α e IL-6 em modelos de inflamação pulmonar induzida por bleomicina ou LPS. A capacidade do tetrandrina em inibir a produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi correlacionada com a inibição da via das MAPKs e do NF κ B (SEOW *et al.*, 1989; LIN, S. T. *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2011).

Além das citocinas, as quimiocinas estão envolvidas no processo de migração leucocitária durante a inflamação. Elas controlam seletivamente, e muitas vezes especificamente, a adesão, quimiotaxia e ativação de muitos tipos de populações e subpopulações de leucócitos. Conseqüentemente, essas moléculas são importantes reguladores do tráfego de leucócitos. Algumas quimiocinas estão primariamente envolvidas em processos inflamatórios agudos, como a quimiocina de camundongos KC (CXCL1) (IL-8 humanos) e MCP-1 (CCL2). A KC/CXCL1 e a MCP-1, assim como outras quimiocinas, estão nos tecido durante a inflamação e são produzidas por uma

variedade de células sob efeitos de mediadores inflamatórios tais como, TNF- α , IL-1 β e LPS (STRIETER e KUNKEL, 1993; PROOST *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2009).

A KC/CXCL1 é a principal molécula quimioatratante para neutrófilos e se liga em receptores do tipo CXCR2, presente nos neutrófilos (LOMAS-NEIRA *et al.*, 2004; GRESPAN *et al.*, 2008; PHILLIPSON e KUBES, 2011). Essa quimiocina é encontrada na cavidade pleural de camundongos quando desafiados com LPS e o bloqueio desta molécula resultou na apoptose dos neutrófilos nos pulmões (BOZIC *et al.*, 1995; FREVERT *et al.*, 1995). Em adição, elevados níveis da KC/CXCL1 têm sido encontrados em doenças como, artrite, glomerunefrite, cardite e aterosclerose tornando-se um promissor alvo terapêutico (RITZMAN *et al.*, 2010).

A MCP-1 é um membro da família de quimiocinas CC e um potente quimioatratante de monócitos e células T CD4+. O MCP-1 regula a migração e infiltração de monócitos para o sítio inflamatório. Do ponto de vista clínico é uma das mais estudadas moléculas inflamatórias entre os membros da família CC e um potencial alvo terapêutico no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes tais com: esclerose múltipla, aterosclerose, diabetes insulino-dependente, artrite reumatóide e nefrite lúpica (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003; KUSANO *et al.*, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004; KULKARNI *et al.*, 2009). O bloqueio do MCP-1 também é um alvo promissor na imunoterapia para diversos tipos de câncer (FRIDLENDER *et al.*, 2010). Tem sido reportado que o MCP-1 regula a liberação da KC/CXCL1 nos pulmões de camundongos desafiados com agentes flogísticos e que a neutralização da MCP-1 com anticorpos específicos não só inibe o infiltrado de células como também os níveis séricos de KC/CXCL1 nestes animais (FRINK *et al.*, 2007).

Considerando que os resultados anteriores apontam para mecanismos de ação da curina associados à inibição de mediadores inflamatórios como PGE₂ e citocinas, testamos o alcaloide em modelos de inflamação que induzem a produção de quimiocinas e verificamos que a curina foi capaz de reduzir os níveis de MCP-1 e KC/CXCL1 na cavidade pleural de camundongos desafiados por LPS sem alterar o número de monócitos mas com diminuição de neutrófilos. Esses dados nos permitem sugerir que a inibição na produção da KC/CXCL1 pela curina, pode ser

mediada pela inibição do MCP-1. Experimentos adicionais deverão ser realizados para demonstrar tal fato.

O aumento da sensibilidade à dor é um dos sintomas mais comuns e debilitantes de doenças inflamatórias. A nocicepção está ligada ao processo inflamatório em vários níveis, onde a formação de exsudato, o inchaço dos tecidos e a produção de mediadores inflamatórios são responsáveis pela "dor inflamatória" (TRACEY, 2002). De modo geral a transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (LINLEY *et al.*, 2010). Os estímulos nocivos ativam as terminações nervosas de fibras aferentes sensoriais do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores (GOLD e GEBHART, 2010). O processo inflamatório interfere na atividade das fibras sensoriais aferentes por meio da liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas pró-inflamatórias, PGs, bradicinina, NO. Esses mediadores reduzem o limiar dos nociceptores periféricos, um fenômeno conhecido como "sensibilização periférica" (LATREMOLIERE e WOOLF, 2009). A Sensibilização periférica é a consequência de alterações na transdução de sinal de proteínas, incluindo o receptor de potencial transiente vanilóide-1 (TRPV1) e canais de sódio dependentes de voltagem resistentes a tetrodotoxina (TTX-r) (MORIYAMA *et al.*, 2005; CHENG e JI, 2008; MIYAMOTO *et al.*, 2009). A PGE₂ reduz o limiar dos nociceptores causando "sensibilização periférica" e potencializa a atividade produtora de dor de mediadores incluindo a histamina e bradicinina (MINAMI *et al.*, 2001). A bradicinina quando liberada no local da lesão tecidual age sobre seus receptores que são expressos nos neurônios sensoriais nos terminais periféricos e contribui para a sensibilização periférica (COUTURE e LINDSEY, 2000; COUTURE *et al.*, 2001). PGE₂ e a bradicinina também contribuem para a "sensibilização central", um aumento na excitabilidade do neurônio do corno dorsal da medula espinhal que aumenta a intensidade da dor, aumenta a área de percepção e resulta em dor evocada por estímulos inócuos (MINAMI *et al.*, 2001; KOHNO *et al.*, 2008).

Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α) e NO no plasma correlacionam-se com a elevação da intensidade da dor em pacientes portadores de doenças crônicas (KOCH *et al.*, 2007).

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um típico modelo experimental para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas sensível sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de agentes químicos (KOSTER *et al.*, 1959; NARAYANAN *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2006).

A administração do ácido acético na membrana serosa provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais e redução na coordenação motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral. De acordo com Julius e Basbaum, (2001) a excitabilidade neuronal é alterada pela interação direta dos prótons liberados pela dissociação do ácido acético com canais iônicos presentes sobre as terminações nervosas sensoriais. A resposta nociceptiva ao ácido acético presente na cavidade peritoneal de camundongos também resulta na liberação de diversos mediadores inflamatórios como a PGE₂ e PGF₂α (DERAEDT *et al.*, 1980). Macrófagos e mastócitos peritoneais liberam as citocinas TNFα, IL-1β e IL-8, além de sensibilizar e estimular os neurônios aferentes primários, resultando no aumento da liberação dos neurotransmissores excitatórios tais como o aspartato e o glutamato no fluido cérebro-espinhal (FENG *et al.*, 2003). O mecanismo nociceptivo decorrente da administração de ácido acético também envolve a participação de receptores vanilóides (IKEDA *et al.*, 2001).

A curina induziu aumento no tempo de latência para a primeira contorção abdominal bem como reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético indicando, neste teste, que a curina apresenta atividade antinociceptiva.

Estes resultados são similares aos obtidos por Nakajima *et al.* (2011), onde o tratamento oral de camundongos com o alcaloide neferina reduziu o número de contorções abdominais de forma dose dependente. O extrato metanólico obtido das folhas de *Stephania japonica* (Menispermaceae) com presença dos alcaloides bisbenzilisquinolinicos fangchinolina e tetrandrina reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (RAHMAN *et al.*, 2011). Da mesma forma, alcaloides de outras classes como brucina e brucina-*N*-oxida (alcaloides indólicos) extraídos das sementes de *Strychnos nux-vomica* (YIN *et al.*, 2003) e caulerpina

(alcaloide bis-indol) isolado de algas do gênero *Caulerpa* tem demonstrado reduzir o numero de contorções abdominais por meio desta metodologia (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Outra maneira de avaliar a ação antinociceptiva da curina foi utilizar o teste da formalina descrito inicialmente em gatos e ratos por Dubuisson e Dennis, (1977). A principal característica deste teste é apresentar duas fases diferentes de nocicepção com o envolvimento de estímulos distintos. A primeira fase (0-5 min) (dor neurogênica) está envolvida com a estimulação química tais como substancia P, glutamato, PGs e bradicinina dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A δ , e a segunda fase (15-30 min) com a liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como histamina, serotonina, bradicinina, PGs e neuropeptídeos (FERREIRA *et al.*, 2006; MCNAMARA *et al.*, 2007).

O teste da formalina produz um estímulo nociceptivo de caráter tônico e moderado, que persiste por alguns minutos, e do qual o animal não pode se esquivar. A resposta a aplicação da formalina é a lambida da pata. Este modelo experimental é o que mais se assemelha à condição clínica de dor, sendo um modelo útil para a investigação de fármacos com potencial analgésicos (ABBOTT *et al.*, 1981; ZHAO *et al.*, 2003).

A curina foi capaz de inibir tanto a dor neurogênica (primeira fase) quanto a dor inflamatória (segunda fase) induzida pela formalina. Portanto, a atividade antinociceptiva da curina parece estar correlacionada com o bloqueio da ação da PGE₂ que está envolvida nas duas fases do teste corroborando com resultados acima discutidos.

Poucos trabalhos têm demonstrado a capacidade dos alcaloides em influenciar as respostas nociceptivas induzidas pela formalina. Nakajima *et al.*, (2011) relataram que a neferina (100 mg/kg) ocasionou diminuição no comportamento de lambida de pata nas duas fases do teste da formalina. Entretanto doses menores de neferina (25 mg/kg e 50 mg/kg) ocasionaram atividade antinociceptiva apenas na segunda fase do teste, diferindo do padrão observado com a curina que com uma dose relativamente baixa (2,5 mg/kg) inibiu as duas fases. Sendo assim, os resultados obtidos com a curina sugerem que este alcaloide

apresenta atividade antinociceptiva e atividade analgésica inibindo inclusive a dor inflamatória.

A dor inflamatória é tipicamente caracterizada por calor e hiperalgesia mecânica) e manifesta-se como a expressão da plasticidade neuronal caracterizada por sensibilização periférica de neurônios sensoriais primários nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e/ou sensibilização central do corno dorsal espinhal e cortical dos neurônios (WOOLF e COSTIGAN, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; BHAVE e GEREAU, 2004; KUNER, 2010).

Diversos são os neuromediadores que, quando liberados por macrófagos, mastócito, células endoteliais e nervos traumatizados, pelo processo inflamatório, ativam os nociceptores caracterizando então a hiperalgesia. Dentre esses mediadores estão a bradicinina, PGs, ions H^+ , fatores de crescimento do nervo, citocinas tais como: $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ e quimiocinas tais como MCP-1 (OH *et al.*, 2001; NICOL e VASKO, 2007; BASBAUM *et al.*, 2009).

Com a finalidade de confirmar a hipótese de que a curina apresenta efeito na dor inflamatória, realizou-se o teste da hiperalgesia induzida por LPS, que é uma metodologia sensível e específica usado para mostrar o envolvimento de mecanismos antinociceptivos periféricos (KANAAAN *et al.*, 1997; NAIDU *et al.*, 2010).

A curina apresentou efeito anti-hiperalgésico no modelo de hiperalgesia induzida por LPS e mensurada na placa quente. Este resultado confirma que a curina possui efeito antinociceptivo interferindo na sensibilização periférica dos neurônios.

Há uma ampla variedade de compostos, incluindo a dexametasona, paracetamol, indometacina, e morfina que reduzem a hiperalgesia induzida por LPS em modelos animais (KANAAAN *et al.*, 1997; NAIDU *et al.*, 2010). Em adição, os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios dos alcaloides bisbenzilisquinolinicos tais com tetandrina, cefarantina, neferina, berbamina, fangchinolina, semelhantes estruturalmente a curina vem sendo relatado na literatura, demonstrando que essa classe de alcaloides possuem potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias (RAHMAN *et al.*, 2011; IVANOVSKA *et al.* 1999; FURUSAWA e WU, 2007; ZHAO *et al.* 2010; NAKAJIMA, 2010).

Portanto os resultados obtidos neste estudo confirmam que a curina, um alcaloide do tipo bisbenzilisquinolinico, apresenta efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo por inibir a ação e/ou produção de fatores inflamatórios e algésicos como prostanóides (PGE_2), citocinas e quimiocinas e que os possíveis mecanismos de ação estejam associados a inibição de fatores de transcrições tais como NFkB, ERK e AP-1 e enzimas tais como iNOS e COX. Estudos adicionais serão realizados para a comprovação de tais hipóteses.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o alcaloide bisbenzilisquinolinico curina da planta *Chondodendron platyphyllum* em modelos experimentais de inflamação e analgesia nos possibilitam concluir que:

A curina tem efeito anti-inflamatório via a regulação da permeabilidade vascular impedindo o extravasamento de plasma para o local inflamado devido, em parte, ao bloqueio da ação da PGE₂; tem efeito anti-inflamatório via inibição da produção de moléculas inflamatórias tais como citocinas/quimiocinas e NO e consequentemente modulação da migração de neutrófilos para o local inflamado. O efeito anti-inflamatório da curina é independente da bradicinina e IL-1 β .

A curina tem efeito antinociceptivo via inibição da ação de mediadores inflamatórios relacionados a dor inflamatória tais como a PGE₂ e NO.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; LUDWICK, R. J. et al. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 15, n. 4, p. 637-640, Oct 1981.

ABRHAM, G.; DOVRAT, S.; BESSLER, H. et al. Inhibition of Inflammatory Cytokine Secretion by Plant-Derived Compounds Inuviscolide and Tomentosin: The Role of NFκB and STAT1. **The Open Pharmacology Journal**, v. 4, p. 8, 2010.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K. et al. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, Nov 30 2006.

AKESSON, C.; LINDGREN, H.; PERO, R. W. et al. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-kappa B activity without inducing cell death. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 13-14, p. 1889-1900, Dec 2003.

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

ALEXANDRAKI, K.; PIPERI, C.; KALOFOUTIS, C. et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1084, p. 89-117, Nov 2006.

ALLEN-HALL, L.; CANO, P.; ARNASON, J. T. et al. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1β and TNF-α. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 312-317, Jan 19 2007.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATAN, F. et al. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 10, p. RA225-234, Oct 2006.

ALTZNAUER, F.; MARTINELLI, S.; YOUSEFI, S. et al. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 10, p. 1343-1354, May 17 2004.

ALVAREZ, Y.; MUNICIO, C.; ALONSO, S. et al. Cyclooxygenase-2 induced by zymosan in human monocyte-derived dendritic cells shows high stability, and its expression is enhanced by atorvastatin. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 329, n. 3, p. 987-994, Jun 2009.

AL-GHAMDI, M. S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 45-48, 2001.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, May 2007.

ANDERSON, G. D.; HAUSER, S. D.; MCGARITY, K. L. et al. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 11, p. 2672-2679, Jun 1 1996.

ANGERHOFER, C. K.; GUINAUDEAU, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 59-66, 1999.

ANSARI, A. W.; HEIKEN, H.; MEYER-OLSON, D. et al. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. **European journal of immunology**, v. 41, n. 12, p. 3412-3418, Dec 2011.

ARAUJO, R. C.; KETTRITZ, R.; FICHTNER, I. et al. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. **Biological chemistry**, v. 382, n. 1, p. 91-95, Jan 2001.

ARMSTRONG, R. A.; MARR, C.; JONES, R. L. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. **Prostaglandins**, v. 49, n. 4, p. 205-224, Apr 1995.

BACON, K. B.; OPPENHEIM, J. J. Chemokines in disease models and pathogenesis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 2, p. 167-173, Jun 1998.

BAKSHI, S.; BERGMAN, M.; DOVRAT, S. et al. Unique natural antioxidants (NAOs) and derived purified components inhibit cell cycle progression by downregulation of ppRb and E2F in human PC3 prostate cancer cells. **FEBS letters**, v. 573, n. 1-3, p. 31-37, Aug 27 2004.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 405-406, Sep 23 2004.

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, N. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Journal of the Brazilian Association Advanced Science** v. 49, p. 8, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the menispermaceae. **The Alkaloids, Copyright**, v. 54, p. 1-190, 2000.

BARREIRO, O.; MARTIN, P.; GONZALEZ-AMARO, R. et al. Molecular cues guiding inflammatory responses. **Cardiovascular research**, v. 86, n. 2, p. 174-182, May 1 2010.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, Oct 16 2009.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M. et al. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 241-245, 2006.

BERGIN, D. A.; REEVES, E. P.; MELEADY, P. et al. alpha-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 12, p. 4236-4250, Dec 1 2010.

BERTAZZI, D. T.; DE ASSIS-PANDOCHI, A. I.; AZZOLINI, A. E. et al. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 41, n. 4, p. 501-508, Mar 2003.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p. 1152-1160, Jul 2006.

BHAVE, G.; GEREAU, R. W. T. Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. **Journal of neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 88-106, Oct 2004.

BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological reviews**, v. 44, n. 1, p. 1-80, Mar 1992.

BISSET, N.G. Curare-botany, chemistry, and pharmacology. **Acta Amazonica** v. 18, p. 255-290, 1988.

BOZIC, C. R.; KOLAKOWSKI, L. F., JR.; GERARD, N. P. et al. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. **Journal of immunology**, v. 154, n. 11, p. 6048-6057, Jun 1 1995.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J. et al. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 51, n. 6, p. 283-289, Jun 2002.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, Feb-Apr 2005.

CAILHIER, J. F.; SAWATZKY, D. A.; KIPARI, T. et al. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 5, p. 540-547, Mar 1 2006.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, Jul 2000.

_____. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current opinion in anaesthesiology**, v. 14, n. 5, p. 519-526, Oct 2001.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta medica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, Nov 2003.

CANETTI, C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H. et al. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 8, p. 1619-1628, Dec 2001.

CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-411, Aug 13 2008.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O. L.; ESPEVIK, T. et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 69, n. 6, p. 479-491, Jun 2009.

CESBRON-GAUTIER, A.; SIMON, P.; ACHARD, L. et al. [Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]. **Annales de biologie clinique**, v. 62, n. 1, p. 93-98, Jan-Feb 2004.

CHEN, Y.; WU, J. M.; LIN, T. Y. et al. Tetrandrine ameliorated reperfusion injury of small bowel transplantation. **Journal of pediatric surgery**, v. 44, n. 11, p. 2145-2152, Nov 2009.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical research**, v. 33, n. 10, p. 1970-1978, Oct 2008.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J. et al. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nature immunology**, v. 1, n. 6, p. 510-514, Dec 2000.

CHUNG, Y.-M.; CHANG, F.-R.; TSENG, T.-F. et al. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.

CHURCH, M. K. Histamine and Its Receptors Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms. In: PAWANKAR, R.; HOLGATE, S. T., et al (Ed.): Springer Japan, v.2, 2009. p.329-356. (Allergy Frontiers). ISBN 978-4-431-88315-9.

CISNEROS, F. J.; JAYO, M.; NIEDZIELA, L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 355-364, Jan 15 2005.

CLAVEAU, D.; SIRINYAN, M.; GUAY, J. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production in the rat adjuvant-induced arthritis model. **Journal of immunology**, v. 170, n. 9, p. 4738-4744, May 1 2003.

COCHRAN, B. H.; REFFEL, A. C.; STILES, C. D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 939-947, Jul 1983.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA FILHO, J. M. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 519-525, Apr 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robins Patologia estrutural e funcional**. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 161-176, Oct 19 2001.

COUTURE, R.; LINDSEY, C. J. Chapter VII Brain kallikrein–kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: R. QUIRION, A. B. e HÖKFELT, T. (Ed.). **Handbook of Chemical Neuroanatomy**: Elsevier, v. Volume 16, 2000. p.241-300. ISBN 0924-8196.

CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L.; RISTIMAKI, A. P. et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **The Journal of clinical investigation**, v. 93, n. 3, p. 1095-1101, Mar 1994.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 52, n. 1, p. 72-82, Jul 2005.

DA SILVA, K. A. B. S.; MANJAVACHI, M. N.; PASZCUK, A. F. et al. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesics effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 967-977, 2012.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, Aug 15 2008.

DE SOUZA, E. T.; DE LIRA, D. P.; DE QUEIROZ, A. C. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine drugs**, v. 7, n. 4, p. 689-704, 2009.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European journal of pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, Jan 11 1980.

DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1083, n. 2, p. 121-134, May 8 1991.

DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S. et al. Mechanisms involved in the vasodilator effect of curine in rat resistance arteries. **Planta medica**, v. 68, n. 11, p. 1049-1051, Nov 2002.

DRAPIER, J. C.; HIBBS, J. B., JR. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. **The Journal of clinical investigation**, v. 78, n. 3, p. 790-797, Sep 1986.

_____. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. **Journal of immunology**, v. 140, n. 8, p. 2829-2838, Apr 15 1988.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, Dec 1977.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M. et al. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-183, Oct 2006.

FADOK, V. A.; WARNER, M. L.; BRATTON, D. L. et al. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). **Journal of immunology**, v. 161, n. 11, p. 6250-6257, Dec 1 1998.

FANTUZZI, G.; SACCO, S.; GHEZZI, P. et al. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 1 Pt 2, p. R400-406, Jul 1997.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 2, p. d12-26, Jan 1 1997.

FELDMANN, M.; MAINI, S. R. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. **Immunological reviews**, v. 223, p. 7-19, Jun 2008.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98, n. 3, p. 729-733, Mar 2003.

FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. et al. Antinociceptive effect from Ipomoea cairica extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 148-153, Apr 21 2006.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; ARAUJO, R. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188-1197, Dec 2002.

FIGARELLA-BRANGER, D.; CIVATTE, M.; BARTOLI, C. et al. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle & nerve**, v. 28, n. 6, p. 659-682, Dec 2003.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y. et al. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 295-301, Jul 1 1997.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, Dec 1 1989.

FLOHE, S. B.; FLOHE, S.; SCHADE, F. U. Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. **Innate immunity**, v. 14, n. 6, p. 333-344, Dec 2008.

FOURNET, A.; ANGELO-BARRIOS, A.; MUÍOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Leishmania sp. in BALB/c mice. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 281-284, 1993.

FREVERT, C. W.; HUANG, S.; DANAE, H. et al. Functional characterization of the rat chemokine KC and its importance in neutrophil recruitment in a rat model of pulmonary inflammation. **Journal of immunology**, v. 154, n. 1, p. 335-344, Jan 1 1995.

FRIDLENDER, Z. G.; BUCHLIS, G.; KAPOOR, V. et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. **Cancer research**, v. 70, n. 1, p. 109-118, Jan 1 2010.

FRIESEN, R. W.; MANCINI, J. A. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1): a novel anti-inflammatory therapeutic target. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4059-4067, Jul 24 2008.

FRINK, M.; HSIEH, Y. C.; HSIEH, C. H. et al. Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. **Shock**, v. 28, n. 5, p. 576-581, Nov 2007.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, Jun 2005.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 1, p. 114-119, Feb 2001.

GASSE, P.; RITEAU, N.; CHARRON, S. et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 179, n. 10, p. 903-913, May 15 2009.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, Feb 5 2010.

GILANI, A. H.; ATTA UR, R. Trends in ethnopharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248-1257, Nov 2010.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 1, p. 52-63, Jan 2007.

GREGORY, A. D.; HOGUE, L. A.; FERKOL, T. W. et al. Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3235-3243, Apr 15 2007.

GRESPLAN, R.; FUKADA, S. Y.; LEMOS, H. P. et al. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 58, n. 7, p. 2030-2040, Jul 2008.

GUEDES, D. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S. et al. Mechanism of the vasodilator effect of 12-O-methylcurine in rat aortic rings. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 853-858, Jun 2002.

HE, M.; LAU, H. Y.; NG, S. W. et al. Chemokines in acute inflammation: regulation, function and therapeutic strategies. **International Journal of Integrative Biology**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

HEIJMANS-ANTONISSEN, C.; WESSELDIJK, F.; MUNNIKES, R. J. et al. Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. **Mediators of inflammation**, v. 2006, n. 1, p. 28398, 2006.

HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5-29, Jan 2005.

HERNANDEZ, V.; DEL CARMEN RECIO, M.; MANEZ, S. et al. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. **Planta medica**, v. 67, n. 8, p. 726-731, Nov 2001.

HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 2, p. 716-723, Sep 17 1984.

HIKINO, H.; KONNO, C.; TAKATA, H. et al. Antiinflammatory principles of Aconitum roots. **Journal of pharmacobio-dynamics**, v. 3, n. 10, p. 514-525, Oct 1980.

HINSON, R. M.; WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 10, p. 4885-4890, May 14 1996.

HOGG, N.; HENDERSON, R.; LEITINGER, B. et al. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunological reviews**, v. 186, p. 164-171, Aug 2002.

HORIUCHI, M.; SEYAMA, Y. Antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. . **Journal of Health Science**, v. 52, n. 6, p. 17, 2006.

HORIUCHI, M.; WACHI, H.; SEYAMA, Y. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff on experimental gastric lesion. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 4, p. 430-435, Oct 2010.

HUANG, Z. F.; MASSEY, J. B.; VIA, D. P. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-

alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 187-194, Jan 15 2000.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, Jul 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, Nov 2 2001.

INAOKI, M.; SATO, S.; SHIMADA, Y. et al. Elevated serum levels of soluble L-selectin in patients with systemic sclerosis declined after intravenous injection of lipoprostaglandin E1. **Journal of dermatological science**, v. 25, n. 1, p. 78-82, Jan 2001.

IVANOVSKA, N.; NIKOLOVA, P.; HRISTOVA, M. et al. Complement modulatory activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids isolated from *Isopyrum thalictroides*--I. Influence on classical pathway in human serum. **International journal of immunopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 325-336, May 1999.

IVANOVSKA, N.; PHILIPPOV, S. Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. **International journal of immunopharmacology**, v. 18, n. 10, p. 553-561, Oct 1996.

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

JAHAN, R.; KHATUN, M. A.; NAHAR, N. et al. Use of Menispermaceae family plants in folk medicine of Bangladesh. **American Eurasian Network for Scientific Information**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2010.

JAKOBSSON, P. J.; THOREN, S.; MORGENSTERN, R. et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7220-7225, Jun 22 1999.

JIA, T.; SERBINA, N. V.; BRANDL, K. et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of immunology**, v. 180, n. 10, p. 6846-6853, May 15 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, Sep 13 2001.

KAMEI, D.; YAMAKAWA, K.; TAKEGOSHI, Y. et al. Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33684-33695, Aug 6 2004.

KANAAN, S. A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; HADDAD, J. J. et al. Effects of various analgesic and anti-inflammatory drugs on endotoxin-induced hyperalgesia in rats and mice. **Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 285-297, Jun 1997.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T. et al. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 273-279, Jun 2005.

KHAJAH, M.; MILLEN, B.; CARA, D. C. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 6, p. 945-953, Jun 2011.

KHAN, A. L.; HUSSAIN, J.; HAMAYUN, M. et al. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. **Molecules**, v. 15, n. 3, p. 1562-1577, Mar 2010.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 135-148, Feb 2001.

KINGSTON, W. P.; GREAVES, M. W. Actions of prostaglandin E2 metabolites on skin microcirculation. **Agents and actions**, v. 16, n. 1-2, p. 13-14, Mar 1985.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p. 1119-1125, 1998.

KOCH, A.; ZACHAROWSKI, K.; BOEHM, O. et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 32-37, 2007.

KOCH, A. E.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A. et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 3, p. 772-779, Sep 1992.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Inhibitors of the microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 as alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)--a critical review. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 32, p. 4274-4296, 2009.

KOHNO, T.; WANG, H.; AMAYA, F. et al. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 17, p. 4533-4540, Apr 23 2008.

KOJIMA, F.; NARABA, H.; MIYAMOTO, S. et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 6, n. 4, p. R355-365, 2004.

KONDO, Y.; TAKANO, F.; HOJO, H. Inhibitory effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on nitric oxide production in activated macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 46, n. 11, p. 1887-1892, Dec 3 1993.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 2, 1959.

KOU, J.; NI, Y.; LI, N. 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, Jan 2005.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 1, n. 2, p. 107-120, Apr 1997.

KUDO, K.; HAGIWARA, S.; HASEGAWA, A. et al. Cepharanthine exerts anti-inflammatory effects via NF-kappaB inhibition in a LPS-induced rat model of systemic inflammation. **The Journal of surgical research**, v. 171, n. 1, p. 199-204, Nov 2011.

KULKARNI, O.; EULBERG, D.; SELVE, N. et al. Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 328, n. 2, p. 371-377, Feb 2009.

KUMAR, S.; JACK, R. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. **Journal of endotoxin research**, v. 12, n. 5, p. 278-284, 2006.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, Nov 2010.

KUPELI, E.; KOSAR, M.; YESILADA, E. et al. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. **Life sciences**, v. 72, n. 6, p. 645-657, Dec 27 2002.

KUSANO, K. F.; NAKAMURA, K.; KUSANO, H. et al. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 68, n. 7, p. 671-676, Jul 2004.

LARSEN, J. M.; BONEFELD, C. M.; POULSEN, S. S. et al. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 123, n. 2, p. 486-492, Feb 2009.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LAUBER, K.; BOHN, E.; KROBER, S. M. et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 717-730, Jun 13 2003.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

- LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B. E.; MUSCARA, M. N. et al. Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. **Life sciences**, v. 72, n. 21, p. 2361-2368, Apr 11 2003.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, Sep 2007.
- LI, H. M.; WANG, Y. Y.; WANG, H. D. et al. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via alpha 2 adrenoceptor-independent mechanisms. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 11, p. 1364-1372, Nov 2011.
- LIN, C. F.; TSAI, C. C.; HUANG, W. C. et al. IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 746-755, Oct 15 2008.
- LIN, S. T.; WANG, Y.; XUE, Y. et al. Tetrandrine suppresses LPS-induced astrocyte activation via modulating IKKs-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 315, n. 1-2, p. 41-49, Aug 2008.
- LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L. et al. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 5, p. 657-669, Apr 2010.
- LIOU, J. T.; CHEN, Z. Y.; HO, L. J. et al. Differential effects of triptolide and tetrandrine on activation of COX-2, NF-kappaB, and AP-1 and virus production in dengue virus-infected human lung cells. **European journal of pharmacology**, v. 589, n. 1-3, p. 288-298, Jul 28 2008.
- LOMAS-NEIRA, J. L.; CHUNG, C. S.; GRUTKOSKI, P. S. et al. CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 1, p. 58-64, Jul 2004.
- LOWE, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 5, p. 531-538, Oct 2003.
- LU, D. Y.; TANG, C. H.; CHEN, Y. H. et al. Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 3, p. 697-705, Jun 1 2010.
- MACZYNSKA, I.; MILLO, B.; RATAJCZAK-STEFANIŃSKA, V. et al. Proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 and TNF- α) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE). **Immunology letters**, v. 102, n. 1, p. 79-82, 2006.
- MAJNO, G. **The Healing Hand - Man and wound in the ancient world**. Cambridge: MA: Harvard University Press, 1975.
- MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology**. New York: **Oxford University Press**, 2 ed, 2004.

MAMBOLE, A.; BIGOT, S.; BARUCH, D. et al. Human neutrophil integrin alpha9beta1: up-regulation by cell activation and synergy with beta2 integrins during adhesion to endothelium under flow. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 2, p. 321-327, Aug 2010.

MANEZ, S.; HERNANDEZ, V.; GINER, R. M. et al. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 4, p. 329-331, Jun 2007.

MANEZ, S.; RECIO, M. C.; GIL, I. et al. A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. **Journal of natural products**, v. 62, n. 4, p. 601-604, Apr 1999.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 845-852, Oct 2004.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European journal of immunology**, v. 25, n. 4, p. 947-951, Apr 1995.

MARI, A. O. **Aspectos anatômicos e etnofarmacológicos de *Abuta grandifolia* (Mart.) sandwith (MENISPERMACEAE) como contribuição ao estudo farmacaognóstico de plantas da Amazônia**. 2007. Dissertação (Mestrado programa integrado em pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais), Instituto nacional de pesquisas da Amazônia, Universidade nacional da Amazônia, Manaus.

MEDEIROS, M. A.; PINHO, J. F.; DE-LIRA, D. P. et al. Curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, blocks L-type Ca^{+2} channels and decreases intracellular Ca^{+2} transients in A7r5 cells. **European journal of pharmacology**, v. 669, n. 1-3, p. 100-107, Nov 1 2011.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MAY, M. J.; WHEELER-JONES, C. P.; PEARSON, J. D. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 7, p. 1761-1771, Aug 1996.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-366, Oct 15 2010.

MCEVER, R. P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 5, p. 581-586, Oct 2002.

MCHALE, J. F.; HARARI, O. A.; MARSHALL, D. et al. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. **Journal of immunology**, v. 163, n. 7, p. 3993-4000, Oct 1 1999.

MCLEAN, P. G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary

venules. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 3, p. 367-380, Aug 7 2000.

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, Aug 14 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, Jul 24 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, Mar 19 2010.

MINAMI, T.; NAKANO, H.; KOBAYASHI, T. et al. Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E2-induced pain responses by use of EP1 and EP3 receptor knockout mice. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 438-444, Jun 2001.

MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 1, p. 75-86, Jan 2006.

MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PETRUS, M. J. et al. TRPV1 and TRPA1 Mediate Peripheral Nitric Oxide-Induced Nociception in Mice. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7596, 2009.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 2, p. 217-252, Jun 2005.

MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of pharmacological sciences**, v. 99, n. 1, p. 6-38, Sep 2005.

MORI, T.; MIYAMOTO, T.; YOSHIDA, H. et al. IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. **International immunology**, v. 23, n. 11, p. 701-712, Nov 2011.

MORIYAMA, T.; HIGASHI, T.; TOGASHI, K. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Molecular pain**, v. 1, p. 3, 2005.

MURAKAMI, K.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M. The prevention of lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by pretreatment with cepharanthine in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, n. 1, p. 57-63, Jan 2000.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 1, p. 3-35, Jan 2004.

NAIDU, P. S.; KINSEY, S. G.; GUO, T. L. et al. Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 182-190, Jul 2010.

NAKAJIMA, H.; TANAHASHI, T.; YAMADA, J. et al. **PSYCOTROPIC AGENT AND HEALTH FOOD CONTAINING NEFERINE**. Japan: Institute of Oriental Medical Science Inc. 2011.

NAOI, K.; KOGURE, S.; SAITO, M. et al. Differential effects of selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors on anorexic response and prostaglandin generation in various tissues induced by zymosan. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1319-1324, Jul 2006.

NARAYANAN, N.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; VISWANATHAN, S. et al. Antipyretic, antinociceptive and anti-inflammatory activity of Premna herbacea roots. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 147-153, 2000.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, Mar 2006.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13725-13728, May 13 1994.

NAVARRO-GONZALEZ, J. F.; MORA-FERNANDEZ, C.; MUROS DE FUENTES, M. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature reviews. Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327-340, Jun 2011.

NICHOLSON, I.; VARNEY, M.; KANAAN, C. et al. Alloresponses to HLA-DP detected in the primary MLR: correlation with a single amino acid difference. **Human immunology**, v. 55, n. 2, p. 163-169, Jul 1997.

NICOL, G. D.; VASKO, M. R. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? **Molecular interventions**, v. 7, n. 1, p. 26-41, Feb 2007.

NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; VETTER, G. et al. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 9, p. 1622-1624, Jul 2001.

NODA, M.; KARIURA, Y.; AMANO, T. et al. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life sciences**, v. 72, n. 14, p. 1573-1581, Feb 21 2003.

OFEK, I.; SHARON, N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. **Infection and immunity**, v. 56, n. 3, p. 539-547, Mar 1988.

OGAWA, Y.; GRANT, J. A. Mediators of anaphylaxis. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 27, n. 2, p. 249-260, vii, May 2007.

OH, S. B.; TRAN, P. B.; GILLARD, S. E. et al. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **The**

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 21, n. 14, p. 5027-5035, Jul 15 2001.

PAN, L. R.; TANG, Q.; FU, Q. et al. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 11, p. 1334-1338, Nov 2005.

PARISH, C. R. The role of heparan sulphate in inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 9, p. 633-643, Sep 2006.

PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A. et al. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiology & behavior**, v. 97, n. 3-4, p. 279-292, Jun 22 2009.

PEREIRA, R. L.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 31-37, Jun 1999.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.

PIETROVSKI, E. F.; PALUDO, K. S.; MENDES, D. A. et al. B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **Journal of dermatological science**, v. 64, n. 1, p. 23-30, Oct 2011.

PILLINGER, M. H.; CAPODICI, C.; ROSENTHAL, P. et al. Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14540-14545, Nov 24 1998.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

PIUVEZAM, M. R.; PECANHA, L. M.; ALEXANDER, J. et al. *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. 1, p. 93-101, Oct 1999.

PORTANOVA, J. P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G. D. et al. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 883-891, Sep 1 1996.

PORTH, C. M. **Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 1280

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, May 2004.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 1, p. 67-74, Jan 1996.

PUELLMANN, K.; KAMINSKI, W. E.; VOGEL, M. et al. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 39, p. 14441-14446, Sep 26 2006.

PUFAHL, A. R.; NANJAPPAN, P. G.; WOODARD, R. W.; MARLETTA, M. A. "Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages" **Biochemistry**, v. 31, p. 6822-6828, 1992.

PUNZON, C.; ALCAIDE, A.; FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1293-1299, Sep 2003.

RABKIN, Z.; ISRAEL, O.; KEIDAR, Z. Do hyperglycemia and diabetes affect the incidence of false-negative 18F-FDG PET/CT studies in patients evaluated for infection or inflammation and cancer? A Comparative analysis. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1015-1020, Jul 2010.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAHMAN, M. H.; ALAM, M. B.; HOSSAIN, M. S. et al. Antioxidant, Analgesic and Toxic Potentiality of Methanolic Extract of *Stephania Japonica* (Thunb.) Miers. Leaf. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 5, 2011.

RANDIS, T. M.; PURI, K. D.; ZHOU, H. et al. Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. **European journal of immunology**, v. 38, n. 5, p. 1215-1224, May 2008.

RIBEIRO-FILHO, J. **Alcaloides de *Chondodendron platyphyllum* inibem a ativação de eosinófilos e modulam a ação da histamina em modelos de inflamação alérgica experimental**. 2011. Mestrado Departamento de ciências farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

RIDGER, V. C.; PETTIPHER, E. R.; BRYANT, C. E. et al. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **Journal of immunology**, v. 159, n. 1, p. 383-390, Jul 1 1997.

RITZMAN, A. M.; HUGHES-HANKS, J. M.; BLAHO, V. A. et al. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4593-4600, Nov 2010.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents and actions**, v. 43, n. 3-4, p. 86-90, Dec 1994.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.

ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E. In vitro Activity and Mutagenicity of Bisbenzylisoquinolines and Quinones Against Trypanosoma- cruzi Trypomastigotes. **Phytotherapy Research**, V. 8, p. 141-144, 1994.

ROZENBLAT, S.; GROSSMAN, S.; BERGMAN, M. et al. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 369-382, Jan 15 2008.

RUKACHAISIRIKUL, T.; SIRIWATTANAKIT, P.; SUKCHAROENPHOL, K. et al. Chemical constituents and bioactivity of Piper sarmentosum. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 173-176, Aug 2004.

SAADANE, A.; EASTMAN, J.; BERGER, M. et al. Parthenolide inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. **Journal of inflammation**, v. 8, p. 26, 2011.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C. et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 2, p. 389-400, Aug 1 1995.

SAMUELSSON, B.; MORGENSTERN, R.; JAKOBSSON, P. J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. **Pharmacological reviews**, v. 59, n. 3, p. 207-224, Sep 2007.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 7265-7270, Jun 10 2003.

SAVILL, J. S.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 5, p. 1518-1527, Nov 1989.

SCHLACHETZKI, J. C.; FIEBICH, B. L.; HAAKE, E. et al. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, p. 2, 2010.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHNURR, M.; THEN, F.; GALAMBOS, P. et al. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **Journal of immunology**, v. 165, n. 8, p. 4704-4709, Oct 15 2000.

SEMERAD, C. L.; LIU, F.; GREGORY, A. D. et al. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. **Immunity**, v. 17, n. 4, p. 413-423, Oct 2002.

SEOW, W. K.; FERRANTE, A.; GOH, D. B. et al. In vitro immunosuppressive properties of the plant alkaloid tetrandrine. **International archives of allergy and applied immunology**, v. 85, n. 4, p. 410-415, 1988.

SEOW, W. K.; FERRANTE, A.; LI, S. Y. et al. Suppression of human monocyte interleukin 1 production by the plant alkaloid tetrandrine. **Clinical and experimental immunology**, v. 75, n. 1, p. 47-51, Jan 1989.

SEOW, W. K.; LI, S. Y.; THONG, Y. H. Inhibitory effects of tetrandrine on human neutrophil and monocyte adherence. **Immunology letters**, v. 13, n. 1-2, p. 83-88, Aug 1986.

SHAHARA, S.; PROUDFOOT, A. E.; PARK, C. C. et al. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis. **Journal of immunology**, v. 180, n. 5, p. 3447-3456, Mar 1 2008.

SHEPRO, D.; DUNHAM, B. Endothelial cell metabolism of biogenic amines. **Annual review of physiology**, v. 48, p. 335-345, 1986.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762-774, Nov 2011.

SHIGETA, A.; MATSUMOTO, M.; TEDDER, T. F. et al. An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4915-4923, Dec 15 2008.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 7, p. 151-185, 2005.

SMITH, A.; STANLEY, P.; JONES, K. et al. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. **Immunological reviews**, v. 218, p. 135-146, Aug 2007.

SMYTH, E. M.; GROSSER, T.; WANG, M. et al. Prostanoids in health and disease. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, p. S423-428, Apr 2009.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-439, Jun 2010.

SOLOMON, L. M.; JUHLIN, L.; KIRSCHENBAUM, M. B. Prostaglandin on cutaneous vasculature. **The Journal of investigative dermatology**, v. 51, n. 4, p. 280-282, Oct 1968.

SORENSEN, T. L.; RANSOHOFF, R. M.; STRIETER, R. M. et al. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. **European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 11, n. 7, p. 445-449, Jul 2004.

SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 895-904, May 2010.

SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C. et al. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 85-90, Jan 2000.

STADNYK, A.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Immunology today**, v. 12, n. 3, p. A7-12, Mar 1991.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. The immunopathology of chemotactic cytokines. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 351, p. 19-28, 1993.

STRZELECKA, A.; KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Tyrosine phosphorylation and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis. **FEBS letters**, v. 400, n. 1, p. 11-14, Jan 2 1997.

SUDHAKARAN, P. R.; RADHIKA, A.; JACOB, S. S. Monocyte macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities. **Glycoconjugate journal**, v. 24, n. 1, p. 49-55, Jan 2007.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11613-11617, Apr 20 2007.

SUN, S. C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 71-85, Jan 2011.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, M. K.; CHEUNG, L. S. et al. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**, v. 48, n. 1, p. 1-35, 2011.

TAN, B. H.; MEINKEN, C.; BASTIAN, M. et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. **Journal of immunology**, v. 177, n. 3, p. 1864-1871, Aug 1 2006.

TEH, B. S.; SEOW, W. K.; LI, S. Y. et al. Inhibition of prostaglandin and leukotriene generation by the plant alkaloids tetrandrine and berbamine. **International journal of immunopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 321-326, 1990.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; DUARTE, J. C. et al. Bronchodilator activity of an aqueous fraction of an ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 233-238, 1997.

THOMAS, G.; BURNS, F.; PYNE, S. et al. Characterization of an extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 7, p. 496-499, 1997.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B. et al. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 3, p. 451-457, Sep 2006.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, Dec 19-26 2002.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 146, n. 3, p. 857-868, Sep 1 1977.

TSOU, C. L.; PETERS, W.; SI, Y. et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 4, p. 902-909, Apr 2007.

TSOYI, K.; JANG, H. J.; NIZAMUTDINOVA, I. T. et al. PTEN differentially regulates expressions of ICAM-1 and VCAM-1 through PI3K/Akt/GSK-3beta/GATA-6 signaling pathways in TNF-alpha-activated human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 1, p. 115-121, Nov 2010.

VAJJA, B. N.; JULURI, S.; KUMARI, M. et al. Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **International immunopharmacology**, v. 4, n. 7, p. 901-909, Jul 2004.

VAN FURTH, R. Monocyte production during inflammation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 205-211, 1985.

VANE, J. R.; MITCHELL, J. A.; APPLETON, I. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 6, p. 2046-2050, Mar 15 1994.

VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R. et al. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 779-789, Oct 2009.

VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. et al. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 278, n. 1, p. 304-312, Jul 1996.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-374, Sep 2000.

WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry international**, v. 26, n. 1, p. 1-16; discussion 17-26, Jan 1995.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 15, p. 107-113, Jun 2000.

WANG, D.; ZHU, J.; WANG, S. et al. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1290-1294, 2011.

WANG, L.; BROWN, J. R.; VARKI, A. et al. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 1, p. 127-136, Jul 2002.

WANG, Z. Q.; BAPAT, A. S.; RAYANADE, R. J. et al. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. **Immunology**, v. 102, n. 3, p. 331-337, Mar 2001.

WEISSMANN, G.; KORCHAK, H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. **Inflammation**, v. 8 Suppl, p. S3-14, Jun 1984.

WESLEY, R. B., 2ND; MENG, X.; GODIN, D. et al. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 3, p. 432-440, Mar 1998.

WHITTLE, B. A. The Use of Changes in Capillary Permeability in Mice to Distinguish between Narcotic and Nonnarcotic Analgesics. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 22, p. 246-253, Apr 1964.

WIESNER, S.; LEGATE, K. R.; FASSLER, R. Integrin-actin interactions. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 62, n. 10, p. 1081-1099, May 2005.

WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25693-25699, Oct 10 1997.

WILLIAMS, K. I.; HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **The Journal of pathology**, v. 156, n. 2, p. 101-110, Oct 1988.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **The Veterinary quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-16, Jan 2000.

WONG, C. W.; SEOW, W. K.; O'CALLAGHAN, J. W. et al. Comparative effects of tetrandrine and berbamine on subcutaneous air pouch inflammation induced by interleukin-1, tumour necrosis factor and platelet-activating factor. **Agents and actions**, v. 36, n. 1-2, p. 112-118, May 1992.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7723-7730, Jul 6 1999.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, Jun 9 2000.

WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D. L.; MEEKING, D. R. et al. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in Type 1 diabetes. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 6, p. 697-702, Jun 2005.

WU, C. J.; WANG, Y. H.; LIN, C. J. et al. Tetrandrine down-regulates ERK/NF-kappaB signaling and inhibits activation of mesangial cells. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 25, n. 8, p. 1834-1840, Dec 2011.

WU, S. J.; NG, L. T. Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 1, p. 59-62, Jan 2007.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 411, n. 21-22, p. 1570-1579, Nov 11 2010.

YIN, W.; WANG, T. S.; YIN, F. Z. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 205-214, Oct 2003.

YOSHIMURA, T.; ROBINSON, E. A.; TANAKA, S. et al. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. **Journal of immunology**, v. 142, n. 6, p. 1956-1962, Mar 15 1989.

YOSHIMURA, T.; YUHKI, N.; MOORE, S. K. et al. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. **FEBS letters**, v. 244, n. 2, p. 487-493, Feb 27 1989.

ZAKARIA, Z. A.; PATAHUDDIN, H.; MOHAMAD, A. S. et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 42-48, Mar 2 2010.

ZHANG, F.; YU, W.; HARGROVE, J. L. et al. Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 381-386, Apr 2002.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y. et al. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 3, p. 413-421, Jun 2001.

ZHAO, C. S.; TAO, Y. X.; TALL, J. M. et al. Role of micro-opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. **Experimental neurology**, v. 184, n. 2, p. 839-845, Dec 2003.

ZHAO, L.; WANG, X.; CHANG, Q. et al. Neferine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **European journal of pharmacology**, v. 627, n. 1-3, p. 304-312, Feb 10 2010.

ZHENG, Z.; LI, H.; ZHANG, Z. et al. Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB by suppressing I kappa B kinase beta phosphorylation. **Journal of immunology**, v. 187, n. 5, p. 2202-2212, Sep 1 2011.