



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato
aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH

Juliane Pereira da Silva

Maceió, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Juliane Pereira da Silva

Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió, 2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586a Silva, Juliane Pereira da.

Avaliação da atividade antinoceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* KUNTH / Juliane Pereira da Silva, 2009.
xiv, 64 f. : il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 54-64.

Inclui anexos.

1. Plantas medicinais. 2. *Bowdichia virgilioides*. 3. Antialérgico. 4. Atividade antinoceptiva. 5. Atividade antiinflamatória. I. Título

CDU: 615.89

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob a orientação do Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Dedico esta conquista ao melhor pai do mundo, **Domingos Pereira Da Silva** (*in memoriam*). Minha gratidão por todo o amor, ensinamento, compreensão, dedicação e por sempre acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Seria difícil encontrar palavras que pudessem expressar o carinho, gratidão e a amizade que encontrei em todos os momentos dessa jornada, mas espero que essas simples palavras possam representar um pouco do muito que tenho a agradecer.

Ao Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto pela confiança depositada, pela orientação, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por ser exemplo de dedicação e amor ao que faz. Um verdadeiro líder.

Ao Prof. Dr. Renato Rodarte pelo apoio, incentivo e colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular pelo agradabilíssimo convívio e pelas trocas de conhecimento, Prof. Francisco Tovar, Prof. Daniel Gitaí, Nedja Poliana, Diego Coutinho, Victor Xavier, Jennifer, Luciana, Tomas e Karina. Em especial ao Alex Farias (com seu bom humor e entusiasmo), Isabella Agra (uma menina brilhante), Janylle Ferro (exemplo de dedicação e amizade), Betijane Soares (com sua tranquilidade e sempre pronta para ajudar) e Ozileudiane (a mascote), obrigada pelo respeito mútuo, pela amizade e pelo agradável grupo de trabalho que formamos.

A coordenação e aos docentes do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

A secretária da Pós-graduação Aurinete por todo apoio administrativo.

A todos da Turma 2007 do Mestrado em Ciências da Saúde, pelo convívio, amizade e ajuda em vários momentos, em especial, a Juliana, Ariane, Ângela, Adalberto, Benício e Acácia.

A todos do biotério e a todos da equipe da limpeza.

A Diretora Prof^a Dra. Teresinha Calado e a todos do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFAL).

Aos membros da banca e aos suplentes, que tão prontamente aceitaram o convite.

Aos colaboradores desse trabalho: *Arboretum* da UFAL, principalmente a Prof^a Maria Cecília Bello de Lima, Wellington Vasconcelos Araújo e Fabiano de Araújo Silva, a botânica Rosangela Lyra e a Prof^a Lucia Conserva.

Muito obrigada a todos do Laboratório de Inflamação, Laboratório de Imunofarmacologia do IOC-Fiocruz, RJ.

Aos órgãos de fomento, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Alagoas (FAPEAL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha filha Julia, por me ensinar a mais pura e profunda forma de amar.

Ao meu maior incentivador, meu marido Emiliano, sinônimo de companheirismo, amor e amizade, obrigada por realizar comigo este e outros sonhos.

Aos meus amados pais, Graça e Domingos (*in memoriam*) que sempre estiveram do meu lado. Mãe, obrigada pelo carinho, por rezar por mim e pelo incentivo de sempre em toda minha vida.

As minhas irmãs, Juciléia e Juciane, por serem grandes amigas.

A toda a minha família sempre presente, em especial aos meus sobrinhos e queridos, Maria Luiza e Luiz Felipe.

Aos meus sogros, Almezinda e Manoel Barreto pelo apoio e por me adotar como filha.

Aos grandes amigos de perto e de longe (amigos do Rio) que foram essenciais para essa conquista, obrigado por torcerem por mim.

E a Deus por sempre conduzir a minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	1
1. Dor	2
1.1 Mecanismo envolvido na percepção da dor	3
2. Aspectos gerais da resposta inflamatória	5
3. Fármacos utilizados no controle da dor e da inflamação	8
4. O uso de plantas medicinais e fármacos derivados de plantas	10
5. A família Fabacea, o gênero <i>Bawdichia</i> e espécie <i>Bawdichia virgilioides</i>	12
JUSTIFICATIVA	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL e MÉTODOS	19
1. Animal	20
2. Material vegetal e preparo do extrato	20
3. Avaliação da atividade antinociceptiva	20
3.1. Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos	20
3.2. Teste de formalina	21
3.3. Teste da placa quente	21
4. Avaliação da atividade antiinflamatória	21
4.1. Pleurisia induzida por carragenina	21
4.2. Pleurisia alérgica	22
4.3. Avaliação dos leucócitos	22
4.4. Quantificação do RNAm mensageiro de proteínas inflamatórias	22
4.5. Estimulação antigênica tecidual <i>in vitro</i>	23
4.6. Formação de granuloma por implante de algodão	24
4.7. Avaliação da imunidade inespecífica	24
4.8. Avaliação do perfil de toxicidade aguda	25
5. Análise estatística	25
RESULTADOS	26

1. Análise da atividade antinociceptiva do extrato aquoso bruto da casca de <i>Bowdichia virgilioides</i> (EABv)	27
1.1. Efeito do EABv na nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético	27
1.2. Efeito do EABv na nocicepção induzida pela placa quente	31
1.3. Efeito do EABv na nocicepção induzida pela formalina	32
1.4. Efeito do EABv por v.o. ou i.p. na nocicepção induzida por ácido acético	33
2. Análise da atividade antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de <i>Bowdichia virgilioides</i> (EABv)	34
2.1. Efeito do EABv na inflamação induzida por carragenina	34
2.2. Efeito do EABv na inflamação induzida por antígeno	36
2.3. Efeito do EABv no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão	40
2.4. Efeito do EABv sobre a resposta imune inespecífica <i>in vivo</i>	41
2.5. Avaliação preliminar do potencial tóxico do EABv	43
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Duração do efeito antinociceptivo do EABv	29
Figure 2. Efeito do AEBv no modelo de placa quente.....	31
Figura 3. Efeito do tratamento com EABv sobre a nocicepção induzida por formalina	32
Figura 4. Efeito antinociceptivo do EABv quando administrado por v.o. ou i.p. no modelo de contorção induzido por ácido acético	33
Figura 5. Efeito do EABv sobre a pleurisia induzida por carragenina.....	35
Figura 6. Efeito do EABv sobre o acúmulo de proteína induzida por antígeno em animais sensibilizados	36
Figura 7. Efeito do EABv sobre a liberação de histamina em fragmentos de tecido de animais sensibilizados.....	37
Figura 8. Efeito do EABv sobre a eosinófilia induzida por antígeno em animais sensibilizados.....	38
Figura 9. Efeito do EABv sobre a expressão de RNAm nos leucócitos	39
Figura 10. Efeito do tratamento com EABv (10 mg/kg, i.p.) durante 6 dias sobre a formação do tecido granulomatoso	40
Figura 11. Efeito do tratamento com EABv (10 mg/kg, i.p.) durante 6 dias sobre a resposta proliferativa dos linfócitos <i>in vivo</i>	41
Figura 12. Efeito do EABv sobre a fagocitose <i>in vivo</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do extrato aquoso de <i>B. virgilioides</i> na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.....	28
Tabela 2. Sazonalidade não influencia no efeito antinociceptivo do <i>B. virgilioides</i> na contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.	30
Tabela 3. Efeito do tratamento com EABv (100 mg/kg) não altera parâmetros celulares e peso corpóreo de camundongos.....	43

RESUMO

Bowdichia virgilioides é conhecida popularmente como “sucupira-preta”, sendo empregada na medicina popular para o tratamento de diferentes agravos, tais como: doenças inflamatórias, diabetes, artrite e dermatoses. No presente estudo avaliamos o efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* (EABv) utilizando diferentes modelos experimentais. Quando administrado por via oral, o EABv além de reduzir a nocicepção induzida pelo ácido acético, manteve seus efeitos por no mínimo 4 h, fenômeno que não foi revertido pelo tratamento prévio com naloxona. Além disso, o extrato não interferiu no tempo de latência avaliada no modelo de nocicepção térmica (placa quente). Assim, o EABv atinge seus efeitos antinociceptivos por uma via independente do sistema opióide e com ação periférica. Tais efeitos antinociceptivos foram mantidos mesmo quando o extrato foi preparado com cascas coletadas em diferentes meses do ano, indicando que a(s) substância(s) responsável (eis) por este efeito biológico não sofrem influência sazonal. Vale destacar que o EABv administrado por via intraperitoneal atingiu efeitos antinociceptivos em concentração dez vezes menor do que o extrato administrado por via oral. O extrato não foi capaz de interferir com o acúmulo de proteína induzido pela injeção intratorácia de carragenina, porém foi eficaz em suprimir neutrofilia no tempo de 4 h após estímulo. Na inflamação alérgica, o extrato inibiu além do edema anafilático, a eosinofilia pleural, sendo que este influxo celular parece depender da expressão das mensagens IL-5 e CCL11. Na ativação tecidual por antígeno *in vitro*, o EABv inibiu a liberação de histamina após estimulação antigênica, sugerindo efeito direto sobre a desgranulação de mastócitos. No modelo de formação de granuloma, o EABv suprimiu tanto a formação do tecido granulomatoso quanto a resposta linfoproliferativa nos linfonodos braquiais. Além disso, o EABv inibiu a leucocitose induzida por zimosan, bem como a resposta imune inata revelada pela redução na taxa de fagocitose pelos leucócitos. Em adição, o EABv não revelou nenhum efeito tóxico associado ao seu uso. Em conjunto, nossos resultados sustentam o uso popular do extrato aquoso da casca de *B. virgilioides* tendo por base seus efeitos antinociceptivo, antiinflamatórios, antialérgicos e imunossupressores, associada a ausência de toxicidade.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Bowdichia virgilioides*, antinocicepção, antiinflamação, antialérgico.

ABSTRACT

Bowdichia virgilioides is popularly known as "sucupira-preta", and used in folk medicine for the treatment of various diseases such as inflammation, diabetes, arthritis and skin diseases. This study was undertaken to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of crude aqueous extract of the bark of *Bowdichia virgilioides* (EABv) in different experimental models. When administered orally, the EABv reduced the nociception by acetic acid, its effects continued for at least 4 h, a phenomenon which was not reversed by pretreatment with naloxone. Moreover, the extract did not change in the time of latency measured in the model of thermal nociception (hot plate). Thus, the EABv reaches its antinociceptive effects by a pathway independent of the opioid system and with peripheral action. These antinociceptive effects were maintained when even when the extract was prepared from bark collected in different months of the year, indicating that the antinociceptive compounds does not suffer from seasonal influences. The EABv give by i.p. route reaches antinociceptive effects in a concentration ten times lower than the extract administered orally. The EABv was unable to interfere with plasma leakage induced by carrageenan, but was effective in inhibited neutrophilia at 4 h after stimulation. In allergic inflammation, the extract inhibited not only the anaphylactic edema, but also the eosinophilia by a mechanism that seems to depend on the protein production of IL-5 and CCL11. The EABv inhibited the release of histamine after antigenic stimulation of the sensitized tissue *in vitro*, suggesting a direct effect on the mast cells degranulation. In the model of pellet cotton granuloma formation, the EABv inhibited both the formation of granulomatous tissue on the lymphoproliferative response in lymph nodes. Furthermore, the EABv inhibited the leukocytosis induced by zymosan and the innate immune response shown by the decrease in the rate of phagocytosis by leukocytes. In addition, the EABv not revealed any toxic effect associated with its use. Together, our results support the popular use of the aqueous extract of the bark of *B. virgilioides* based on their analgesic, anti-inflammatory, immunosuppressive and anti-allergic effects, associated with a low toxicity.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*, nociception, acute inflammation, allergy, chronic inflammation, folk medicine.

INTRODUÇÃO

1. Dor

A dor é um processo fisiológico essencial para sobrevivência do indivíduo, pois se trata de um sinal capaz de indicar alterações fisiológicas que ocorrem no organismo. Embora seja um processo natural, a dor é sempre referida como uma sensação desagradável e em alguns momentos insuportável mostrando-se presente em diversos estados fisiopatológicos.

Atualmente, a dor é considerada o quinto sinal vital humano junto com temperatura corpórea, pressão arterial, ritmo cardíaco e frequência respiratória. O conceito clássico, definido pelo Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor, refere-se a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual atual ou potencial (MERSKEY, 1990).

A dor afeta pelo menos 30 % dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em 10 a 40 % deles, tem duração superior a um dia. Constitui a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicossociais e econômicas. Estudos revelam que muitos dias de trabalho são perdidos por aproximadamente 40 % dos indivíduos que sofrem algum distúrbio doloroso. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos (SBED, 2009).

A dor pode ser classificada de múltiplas maneiras. Sob o ponto de vista de duração, a sensação dolorosa pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é uma resposta fisiológica às lesões teciduais com conseqüente ativação de mecanismos de reação psicomotora. A dor crônica é provocada por uma lesão que geralmente supera a capacidade de recuperação do organismo, sendo capaz de interferir no comportamento e, podendo ainda, gerar incapacidade física e mental (KELLY & PAYNE 1991).

Quanto a sua origem, a dor pode ser separada em quatro tipos principais, a saber: nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica. A dor nociceptiva é provocada por estímulos sobre os nociceptores localizados nos tecidos. A dor neurogênica reflete um dano tecidual neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (SNC). A dor neuropática acontece devido a uma disfunção ou dano no tecido nervoso. Enquanto que a dor psicogênica origina-se de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

1.1. Mecanismos envolvidos na percepção da dor

No princípio do século XX, Sherrington (1906) propôs a existência de receptores capazes de perceber estímulos nocivos, o qual definiu como um neurônio sensorial primário, chamado nociceptor (SHERRINGTON, 1906). Os nociceptores são terminações nervosas livres presentes em tecidos periféricos, profundos e viscerais. Estas terminações nervosas são ativadas por estímulos exógenos de diversas naturezas, incluindo estímulos mecânicos, químicos, térmicos, além de estímulos endógenos como inflamação, aumento do peristaltismo e isquemia tecidual.

Os nociceptores se diferenciam dos outros receptores sensoriais específicos por possuírem um limiar mais alto de ativação. Assim, somente são ativados quando o estímulo apresenta intensidade nociva. Tais terminações nervosas livres são classificadas quanto a critérios anatômicos e funcionais em três tipos: fibra C, fibra A δ e fibra A β (TREEDE, 1995).

As fibras C são delgadas (0,4 - 1,2 μ m), não mielinizadas, e apresentam baixa velocidade de condução (0,5 a 2 m/s), sendo conhecidas também como “nociceptivas polimodais tipo C”, essas fibras conduzem sinais relacionados à dor crônica, em geral, de uma reação inflamatória. Ao contrário, as fibras A δ são mielinizadas com diâmetro intermediário (2 - 6 μ m) e velocidade de condução que varia de 6 a 30 m/s, sendo responsáveis por conduzir sinais associados à dor aguda. As fibras A β possuem maior diâmetro (> 10 μ m), são mielinizadas e exibem condução rápida do sinal variando de 30 - 100 m/s (MILLAN 1999). Somente as fibras A β não conduzem informação nociceptiva, sendo ativadas por estímulos de baixa intensidade de natureza mecânica como: toque, vibração e pressão (MENSE 1993, WOOLF, 1994).

A ativação dos nociceptores em resposta a estímulos nocivos leva à despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra (WOOLF & SALTER, 2000). Assim, quando um dano inicial (lesão ou induzido por inflamação) ativa os nociceptores locais, as fibras nervosas A δ e C ficam sensibilizadas e assumem limiares de ativação mais baixos. Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A δ (que conduzem a designada dor primária) e a

nocicepção difusa e lenta, em queimação, é elicitada por fibras C (dor secundária). A dor visceral é única, no sentido de que não existem os componentes primário e secundário. Ao contrário, a dor visceral freqüentemente é pouco localizada, profunda e lenta (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Após a interação direta ou indireta com neurônios de projeção no corno dorsal, os axônios de neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencéfalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (ALMEIDA e col., 2004).

O tálamo desempenha um papel fundamental como região responsável pela integração do impulso da dor. A partir do tálamo, neurônios transmitem impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999). O tálamo está envolvido na recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo. As diferentes projeções para seus núcleos e deles para o córtex definem circuito funcional de processamento da dor. O núcleo ventroposterolateral do tálamo é reconhecido como o principal centro somatossensorial, pois recebe estímulos inócuos e nocivos de diferentes origens e responsabiliza-se pelos aspectos de localização e intensidade da dor (WENG e col., 2000). A divisão posterior do núcleo ventromedial e o núcleo posterior são partes integrantes do sistema nociceptivo, estabelecendo conexões com os córtices insular e cingulado, responsáveis pelos aspectos cognitivos e afetivos da dor (TREEDE e col, 1999).

A sensibilização dos nociceptores acontece em decorrência de estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo estes responsáveis pela liberação local de diversos mediadores, que medeiam a transmissão da informação ao SNC. Esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sangüíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann. Em um quadro crônico, há também participação de mediadores liberados a partir de células inflamatórias interferindo na transmissão nociceptiva (BESSION, 1999).

Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e na transmissão da dor, destacando-se entre eles, os metabólitos derivados do ácido araquidônico,

peptídeos, citocinas, óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP), entre outros. Além destes, aminoácidos excitatórios e acetilcolina, por exemplo, podem ser produzidos e liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina e ácido acético). Estes mediadores podem atuar também em eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto central (MILLAN, 1999; CALIXTO e col., 2000; PETERSEN-ZEITZ e BASBAUM, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; JULIUS e BASBAUM, 2001).

2. Aspectos gerais da resposta inflamatória

Inflamação pode ser definida como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos com propósito de erradicar o agente agressor e proporcionar o reparo tecidual (HANSSON, 2005).

As reações inflamatórias podem ser caracterizadas por aumento do fluxo sangüíneo e aumento na permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os quatro sinais típicos da presença de inflamação: rubor, tumor, calor e dor. O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX (COTRAN e col., 2000).

As causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável. São reconhecidos os seguintes tipos de agentes inflamatórios: agentes biológicos (como bactérias, vírus, protozoários); agentes químicos (como ácidos, álcalis, formaldeído); agentes físicos (como calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, traumatismos, fraturas, incisões) e agentes imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro).

De modo geral, a inflamação pode ser classificada em aguda e crônica levando-se em conta o período de duração e características patológicas do sítio inflamado. A inflamação aguda se estende de horas a dias, sendo caracterizada por vasodilatação, exsudação plasmática e migração de células para o sítio lesado. Processos patológicos causados pela exacerbação de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepsis, traumas severos e grandes cirurgias são exemplos

de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos. Por outro lado, Artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, asma, silicose e aterosclerose são exemplos de doenças inflamatórias crônicas.

As desordens crônicas são caracterizadas por longa duração (semanas, meses ou anos) com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo ocorrendo simultaneamente. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas de inflamação crônica. (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Além disso, em algumas situações inflamatórias crônicas a formação do tecido granulomatoso mostra-se como uma das mais importantes seqüelas de desfecho. O granuloma estrutura-se como um conjunto de células inflamatórias, principalmente macrófagos e linfócitos, que estão eventualmente cercados por uma camada fibrótica, formando um tecido como consequência de uma resposta inflamatória persistente (WUNN e CHEEVER, 1995).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais típicos da inflamação descritos anteriormente. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e se desenvolvem durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma (WILLIAMS, 1983). Em condições normais a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (GILROY e col., 2004). Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases típicas como: captura, rolamento, adesão firme e transmigração dos leucócitos (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (SPRINGER, 1994). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do

organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo.

Nos estágios iniciais de uma resposta inflamatória aguda, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (BROCHE e TELLADO, 2001; BOYTON e OPENSHAW, 2002).

Diferentes células envolvidas na resposta inflamatória são capazes de produzir vários mediadores pró-inflamatórios e/ou nociceptivos como aminas vasoativas, mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas (VERRI e col., 2006). A liberação de aminas vasoativas, histamina e serotonina, ocorre através da desgranulação mastocitária após estimulação antígeno-dependente ou estímulos não imunológicos tais como substância P (HUA e col., 1996), neuroquinina A (JOSS e GEBBERS 1993), ATP extracelular (SUDO e col., 1996) dentre outros. Desta forma tais mediadores estão implicados tanto nos processos de nocicepção quanto no disparo da reação alérgica (BESSON, 1997).

Os derivados da metabolização do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos, produzidos respectivamente pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, mostram-se como importantes mediadores lipídicos atuante no processo inflamatório (GONZALEZ-REY e col., 2007). Existem três isoformas de ciclooxigenases identificadas, a COX-1, a COX-2 e a COX-3, que se distinguem na forma de expressão e atuação em processos fisiopatológicos (SENIOR, 2002).

Diferentes estudos descrevem que várias citocinas e quimiocinas induzem seus efeitos sobre células do sistema imune ou do SNC por atuarem diretamente sobre nociceptores periféricos (COUTAUX e col., 2005; OBREJA e col., 2002). Assim, destacam-se: interferons, interleucinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fatores de crescimento e as quimiocinas. Dentre as quimiocinas, moléculas como CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein-1 α , MIP-1 α), CXCL8 (keratinocyte-derived

chemokine, KC) e CCL11 (eotaxina) exercem um importante papel no processo inflamatório (OKAJIMA e HARADA, 2006; VERRI e col., 2006).

3. Fármacos utilizados no controle da dor e inflamação

Atualmente, vários medicamentos para o controle da dor e inflamação encontram-se disponíveis para uso clínico, tais como analgésicos, dentre eles os opióides, os antiinflamatórios esteroidais e os não-esteroidais (AINE).

Os opióides possuem destacada ação central, desencadeando potente analgesia associada à depressão das funções neurovegetativas e da consciência. Somam-se a esta ação analgésica as características sedativas e hipnóticas, tendência a produzir dependência psíquica e física, e produção de tolerância, sendo estes dois últimos fatores limitantes para uso em tratamentos prolongados (OLIVEIRA, 2003; GILBERT e col., 2004).

Fármacos AINE são os medicamentos mais usados no alívio da dor e inflamação. Os AINE atualmente disponíveis agem, em sua maioria, inibindo a atividade das COX-1 e COX-2, suprimindo assim, a síntese de prostaglandinas e tromboxanos. Exemplos de AINE incluem o ácido acetil salicílico, que acetila irreversivelmente a COX, e vários outros tipos de ácidos orgânicos, como o ibuprofeno, derivado do ácido propiônico, indometacina, derivado do ácido acético, e o piroxicam, derivado do ácido enólico. Sendo que todos estes derivados de ácidos competem com o ácido araquidônico pelo sitio ativo da COX (BURIAN e GEISLINGER, 2005).

A COX-1 é expressa constitutivamente a sua inibição pelos AINE não-seletivos é a base dos efeitos colaterais observados com uso desses inibidores, principalmente sobre o trato gastrointestinal. Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2 está envolvida na estratégia terapêutica de escolha para o tratamento de condições inflamatórias (EL-ALWANI e col., 2006). A expressão da COX-2 é induzida por estimulantes inflamatórios como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas, citocinas proinflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e fatores de crescimento; enquanto sua expressão é inibida por glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias (EL ALWANI e col., 2006). O rofecoxib e o celecoxib, fármacos da classe designada coxibs, são exemplos de inibidores seletivos da COX-2 (HAWKEY, 2005).

Fármacos esteroidais e glicocorticóides possuem grande amplitude de ações farmacológicas, dentre elas, seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores, agindo tanto nas manifestações iniciais quanto nas tardias do processo inflamatório (ADCOCK & ITO, 2005). Tais substâncias atingem seus efeitos principalmente devido à inibição da migração celular para a área afetada, através da supressão da expressão de moléculas de adesão, ou da indução da síntese de uma proteína inibidora de fosfolipase A2 (enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico), a anexina-1 (também conhecida como lipocortina). Estes efeitos são atingidos após ativação de receptores nucleares para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam a COX-2 e a óxido nítrico sintase. O complexo esteróide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α . Além disso, os corticosteróides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores de citocinas, como dos receptores da IL-2 (BARNES e ADCOCK, 1993; FLOWER e ROTHWELL, 1994; VANE e BOTTING, 1998; MILLAN, 1999).

Há diferentes outros mecanismos pelos quais substâncias com propriedades analgésicas e antiinflamatórias podem atingir seus efeitos, elas podem: 1) atuar como falsos substratos: análogos de precursores naturais dos ácidos graxos podem servir de inibidores competitivos da formação de PGs e produtos da ação das lipoxigenases; 2) atuar como antagonistas de mediadores inflamatórios; 3) bloquear canais de cálcio ou inibindo a calmodulina, diminuindo, assim, a liberação de ácido araquidônico e sua conseqüente metabolização; 4) inibir espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a peroxidação lipídica; 5) atuar também por imunossupressão ou por imunoestimulação, promovendo a fagocitose e assim, ocasionando aumento da remoção de moléculas que provocam danos ao tecido afetado.

Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades antiinflamatórias (com exceção dos opióides) e serem amplamente utilizadas na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tal fato encoraja a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação antiinflamatória e/ou analgésica. Neste contexto, a investigações envolvendo plantas de nossa flora ganha papel de destaque uma vez que vários medicamentos,

utilizados na prática clínica atual, são derivados diretos ou sintetizados a partir de substâncias isoladas de plantas.

4. O uso de plantas medicinais e fármacos derivados de plantas

O uso popular de plantas medicinais acompanha o homem desde os primórdios da civilização, sendo utilizadas no tratamento de diversas doenças e na melhoria da qualidade de vida. Os primeiros registros do uso de plantas medicinais datam de cerca de 3.000 anos a.C. O Papiro de Erbes, decifrado em 1873 por Georg Erbes, representa o primeiro tratado médico conhecido que descreve a prática da fitoterapia (TESKE & TRENTINI, 1997).

Um grande interesse público vem sendo direcionado para as terapias naturais ao longo dos anos. Dentre as terapias de interesse, as plantas destacam-se por apresentarem um ou vários princípios ativos capazes de prevenir, mitigar ou curar as doenças. Tais características estimularam a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1978, a reconhecer oficialmente o uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (SALLÉ, 1996). A utilização de plantas medicinais, tem ocorrido de forma indiscriminada, sem nenhuma base científica sólida, recebendo um destaque exagerado como indispensáveis à boa saúde, a ponto de despertar preocupação por diferentes profissionais. Mesmo assim, na atualidade, as plantas com propriedades medicinais vêm contribuindo de modo concreto para os cuidados básicos com a saúde. Estimativas atuais evidenciam que mais de 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular ou de medicamentos a base de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (MS, 2009).

O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores aumentou expressivamente na última década. Atualmente, muitos fármacos comercializados apresentam estruturas químicas relacionadas a uma molécula extraída de alguma espécie botânica de uso consagrado na medicina popular. Estima-se que em torno de 25% de todos os medicamentos modernos sejam derivados, direta ou indiretamente de plantas superiores (CALIXTO e col., 2000). Nesse contexto, a importância da investigação de plantas medicinais reside principalmente na identificação de protótipos, cuja atividade farmacológica permita o desenvolvimento

de novos fármacos. No entanto, ainda existe um grande desafio a ser enfrentado que é tornar um protótipo num fármaco apropriado para o uso terapêutico (BORRIS, 1996).

No Brasil, mesmo com o incentivo da indústria farmacêutica para a utilização de medicamentos industrializados, grande parte da população ainda se utiliza de práticas complementares para cuidar da saúde. Cabe ressaltar que ainda em algumas regiões brasileiras, em especial na região nordeste, o uso de preparações caseiras com plantas medicinais possui importância fundamental no tratamento das enfermidades que afetam as populações de baixa renda. Sendo este fato influenciado tanto pela grande deficiência na assistência médica, quanto pela influência da transmissão oral dos hábitos culturais e da disponibilidade da flora (MATOS e col., 1989).

As ações públicas que fomentam ações sobre produtos naturais aplicados à saúde, ganharam força em 21 de maio de 1993, onde a Portaria número 546 do Ministério da Saúde criou o Grupo Consumidor Técnico-Científico da Secretária de Vigilância Sanitária, com o intuito de estabelecer normas, controle de serviços, controle de produção, armazenagem e a utilização de substâncias e produtos naturais (DI STASI, 1996). Com isso, a fitoterapia foi reconhecida como prática do sistema de saúde no Brasil. Porém, apenas em 2006 o Ministério da Saúde por meio da portaria Nº 971 da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) normatizou no Sistema Único de Saúde (SUS), o uso de plantas medicinais e fitoterapia dentre outras práticas terapêuticas. Neste mesmo ano, o decreto Nº 813, de 22 de junho aprovou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, estabelecendo diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantir o acesso seguro, o uso racional de plantas medicinais e fitoterápico pela população, bem como a utilização sustentável da biodiversidade em nosso país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Ainda que os medicamentos derivados de plantas tenham uma boa aceitação pela população e estejam presentes no mercado farmacêutico, apenas uma pequena parcela das plantas medicinais possui dados científicos que comprovam sua eficácia e seu espectro toxicológico como garantia de qualidade do produto. Como exemplos relevantes de medicamentos obtidos de plantas, podemos mencionar a morfina (*Papaver somniferum*), a digoxina (*Digitalis sp.*), o taxol (*Taxus*

brevifolia), o quinino (casca da *Chinchona sp*), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), dentre outros (RATES, 2001). Assim, na terapêutica moderna, as plantas medicinais fornecem o substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem a novas entidades químicas.

Dentro deste contexto, o Brasil é um país privilegiado, pois ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, possuindo cerca de 20 % do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001). A imensa variedade de espécies vegetais existentes sem dúvida apresenta um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (KATO e col., 2001). Dentro desta imensa variedade de espécies encontram-se as plantas da Família Fabaceae conhecidas popularmente pela diversidade de aplicações e importância econômica, como produção de alimentos, indústria civil e paisagismo.

5. Considerações sobre a Família Fabaceae, o gênero *Bowdichia* e espécie *Bowdichia virgilioides*

A família Fabaceae mostra-se como uma das maiores famílias botânicas, sendo a terceira maior família das angiospermas, ocorrendo em diferentes tipos de habitats, incluindo áreas tropicais, subtropicais e temperadas. Os representantes desta família estão distribuídos em mais de 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies com hábitos variados, podendo ser herbáceas, trepadeiras, arbustivas ou arbóreas (HEYHOOD, 1996).

As Fabaceae estão subdivididas em 3 subfamílias, a saber: Faboideae, que se apresenta como maior subfamília, possuindo cerca de 429 gêneros e 12.615 espécies, seguida por Caesalpinioideae com cerca de 150 gêneros e 2.700 espécies e Mimosoideae com 40 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (KUMAR e SINGHAL, 2009).

A família Fabaceae vem despontando nos últimos anos como fonte promissora de espécies com atividade terapêutica. Plantas do gênero *Bowdichia*, subfamília Faboideae, são tradicionalmente utilizadas para tratar diversos distúrbios, incluindo reumatismo, dor, úlceras de pele, diabetes, herpes, gonorréia, disenteria, icterícia, asma, infecção brônquica e como abortiva (CALIXTO e col., 1998).

O gênero *Bowdichia* mostra-se constituído por 19 espécies, onde somente duas foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico: *Bowdichia nitida* e *Bowdichia virgilioides*. Recentes estudos fitoquímicos com a espécie *B. nitida* revelaram a presença de alcalóides, xantonas, triterpenóides e isoflavonóides com importantes atividades biológicas, incluindo atividade anti-câncer e anti-parasitária (MATSUNO e col., 2008; 2009).

Bowdichia virgilioides é uma árvore de casca grossa e fendilhada, atinge até 20 metros de altura, apresentando tronco com diâmetro máximo de 60 cm. Possui folhas compostas, pinadas, com folíolos pubescentes. A flor com corola lilás confere um aspecto ornamental e apícola à árvore, que floresce entre os meses de outubro e dezembro. Os frutos são legumes com 3 a 5 cm de comprimento, indiescentes, achatados, contendo pequenas sementes apresentando coloração avermelhada (fotos 1-4). Esta espécie ocorre em vários países da América Latina, sendo que no Brasil, encontra-se distribuída pelas Regiões Sudeste, Centro Oeste, Norte e Nordeste. Nesta última região, é popularmente conhecida como “sucupira”, “sucupira-do-cerrado”, “sucupira-do-campo”, “angelim-amargoso” e “coração-de-negro” (ALMEIDA e col., 1998).

O uso medicinal da espécie *Bowdichia virgilioides* emprega infusões obtidas a partir de diferentes partes da planta (semente, casca da árvore e casca da raiz) para o tratamento da dor, artrite, reumatismo, diabetes, dermatoses, infecções bucais e inflamações. Entretanto, *Bowdichia virgilioides* que é encontrada pelo nordeste brasileiro e amplamente empregada na medicina popular regional para diferentes finalidades, não possui registro de estudos criterioso sobre atividades biológicas, tornando-se alvo em potencial a investigação científica.



Foto 1. Árvore de *B. virgilioides*



Foto 2. Flor de *B. virgilioides*



Foto 3. Fruto de *B. virgilioides*



Foto 4. Caule de *B. virgilioides*

JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, as plantas com propriedades medicinais têm recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido relativamente pouco avaliadas do ponto de vista científico, sendo, dessa forma, necessários estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

Os produtos naturais apresentam-se como fonte de compostos com potencial atividade biológica, assim, a descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou de novos agentes terapêuticos, representa uma possibilidade para o tratamento de diferentes distúrbios inflamatórios e associados à dor, podendo determinar uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

Dessa maneira, a importância deste estudo, se justifica na confirmação das propriedades analgésicas e antiinflamatória da espécie *Bowdichia virgilioides*, tendo como base o seu emprego na medicina popular. Estudos complementares foram realizados com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos e validar seu uso popular.

OBJETIVO

Objetivo geral

No presente trabalho objetivamos avaliar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* em diferentes modelos experimentais, bem como, investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso bruto da casca de *B. virgilioides* utilizando diferentes modelos experimentais para o estudo da dor.
2. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato aquoso bruto da casca de *B. virgilioides* no modelo de pleurisia induzido por diferentes.
3. Avaliar a influência do extrato aquoso bruto da casca de *B. virgilioides* no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão.
4. Avaliar a influência do extrato aquoso bruto da casca de *B. virgilioides* sobre a resposta imune inespecífica *in vivo*.
5. Realizar ensaios preliminares de toxicologia para avaliar o potencial tóxico do extrato aquoso bruto da casca de *B. virgilioides*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos de ambos os sexos (18 a 22 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora (h) antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Protocolo nº 23065.12614/2006-89).

2. Material vegetal e preparo do extrato

Amostras de *Bowdichia virgilioides* foram coletadas no *Arboretum* da UFAL, Campus A.C. Simões nos meses de março, junho, setembro e dezembro do ano de 2006. A espécie foi taxonomicamente identificada pela Profa. Rosângela P. Lyra Lemos, sendo a exsicata da espécie depositada no Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA) sob nº MAC29914.

A obtenção do extrato aquoso da casca de *B. virgilioides*, denominado de EABv, seguiu o preparo utilizado na medicina popular. As cascas de *B. virgilioides* foram secas a temperatura ambiente e depois triturada, o pó (30 gramas) foi colocado em um vasilhame contendo 500 mL de água à temperatura de 100°C , a seguir o recipiente foi fechado permanecendo em repouso para resfriar a temperatura ambiente por 6 h. A seguir, a solução foi filtrada e posteriormente liofilizada.

3. Avaliação da atividade antinociceptiva

3.1. Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0.8 % diluído em água. O total de contorções abdominais foi registrado durante 10 minutos, tendo-se iniciado o registro da contagem 5 minutos após a injeção do ácido acético. O tratamento com EABv (0,1 - 400 mg/kg), soluções salina

(NaCl, 0,9 %) ou indometacina (20 mg/kg), foi feito por via oral (v.o.) ou i.p. por 1 ou até 8 h antes do estímulo álgico.

3.2 Testes de formalina

Neste modelo os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl) contendo 10 µl de solução de formalina a 2,5 % na pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados individualmente, sob funil de vidro invertido para facilitar a observação. O tempo que animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi avaliado durante 30 min, sendo este período considerado indicativo de nocicepção. Este modelo permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 minutos após a formalina, representando a dor inflamatória. Uma hora antes do estímulo nociceptivo os animais foram pré-tratados (v.o.) com EABv (200 mg/kg), salina ou indometacina (20 mg/kg) (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

3.3 Testes da placa quente

Os camundongos foram colocados sobre uma placa de metal aquecida (54 ± 1 °C) e a resposta ao estímulo térmico, ato de saltar ou lamber uma das patas posteriores, foi registrado como tempo de latência. Foi adotado um *cut-off* (o tempo máximo de permanência do animal sobre a placa) de 30 segundos para preservar o animal de possíveis lesões causadas pela exposição a tempos superiores. Os animais foram pré-tratados com EABv (400 mg/kg, v.o), salina ou morfina (5 mg/kg, i.p.), e as medidas do tempo de latência registradas nos seguintes intervalos de tempo (30, 60, 120 e 480 min).

4. Avaliação da atividade antiinflamatória

4.1. Pleurisia induzida por carragenina

A pleurisia foi induzida pela injeção intratorácica (i.t.) de 0,1 mL de uma suspensão de carragenina 1 % diluída em salina estéril. Animais controles receberam o mesmo volume do veículo. Quatro horas após estímulo os animais

foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram a cavidade pleural aberta, lavada com 1 mL de solução de PBS (1X) contendo EDTA (10 mM) e volume recuperado com o auxílio de pipeta automática para posterior análise do conteúdo total de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e de células em câmara de Neubauer e citocentrifugado. Os animais foram pré-tratados com EABv (10 mg/kg, i.p.) ou salina uma hora antes da aplicação do agente inflamatório.

4.2. Pleurisia alérgica

Para este modelo os animais foram sensibilizados através da injeção subcutânea (s.c.) dorsal de uma mistura contendo ovoalbumina (OVA, 50 µg) e hidróxido de alumínio (Al(OH)₃, 5 mg) em volume final de 0,2 mL. Após 14 dias do processo de sensibilização os animais foram desafiados através da injeção intratorácica de OVA na concentração de 12 µg/cavidade, dissolvida em salina estéril em volume final de 0,1 mL. Foram usados como controles negativos os animais sensibilizados desafiados com salina. Nos grupos experimentais, os animais receberam injeção do EABv (10 mg/Kg, i.p.) ou dexametasona (1 mg/kg, i.p.) no tempo de 1 hora antes do desafio. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ em diferentes tempos após o estímulo. A cavidade pleural foi lavada com 1 mL de PBS (1X) contendo EDTA (10 mM) e o lavado foi recuperado com o auxílio de pipeta automática para posterior análise do conteúdo total de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e de células em câmara de Neubauer e citocentrifugado.

4.3. Quantificação de proteína

A quantidade de proteína total da cavidade pleural foi avaliada 30 min após a injeção i.pl. com salina ou estímulo. O lavado pleural recuperado foi centrifugado a 770 x g por 10 min e do sobrenadante livre de células foi quantificado o conteúdo protéico pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) com o auxílio de um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

4.4 Avaliações dos leucócitos

O número total de leucócito recolhido no lavado pleural foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. As amostras foram diluídas (40X) em líquido de Türk. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita em citocentrífugado corados pelo método de Panótico rápido. As contagens da análise diferencial foram realizadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão onde se contou 100 células por lâmina.

4.5. Quantificação do RNA mensageiro de proteínas inflamatórias

Com o objetivo de verificar o efeito dos extratos sobre a indução de proteínas envolvidas na modulação da inflamação alérgica, foram avaliados os níveis do RNA mensageiro (RNAm) para duas proteínas: IL-5 e CCL11 (eotaxina). Para tanto, células foram recolhidas do sítio inflamatório em condições livres de RNase. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e o RNA total extraído utilizando reagente TRIzol. A transcrição reversa (RT) foi realizada com 2 µg de RNA total, utilizando OLIGO DT como *primer* (0,05 µg), RT (50 UI), dNTP (144 µM), tampão de reação (DTT 10 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 75 mM e Tris-HCl 50 mM em pH 8,3) e 2 U de RNAsin Plus, em volume final de 12,5 µl. Para obtenção do DNA complementar (cDNA) as amostras foram aquecidas por 5 min a 70 °C, resfriadas a 4 °C por 5 min e mantidas a 25 °C durante a adição da enzima RT. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 60 min, 70 °C por 5 min e resfriadas a 4 °C por 5 min. A amplificação do cDNA de seqüências de interesse foi obtida por PCR utilizando seus respectivos *primers sense* (IL-5: 5'-TCA TAA AAA TCA CCA GCT ATG C-3' e CCL11: 5'-GCT CAC CCA GGC TCC ATC-3') e *antisense* (IL-5: 5'- TTG GAA TAG CAT TTC CAC AGT -3' e CCL11: 5'-TGT TGT TGG TGA TTC TTT TGT AGC-3'). Para esta reação, alíquotas de 2 µl do RT foram adicionadas e um tampão contendo: TRIS-HCL 10 mM (pH 9), MgCl₂ 1 mM, dNTP 200 µM, 300 nM de cada primer e 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 30 µl. Alíquotas de 5 µl de cada amostra será analisada em gel Tris/borato/EDTA (TBE)-poliacrilamida 6% e coradas com nitrato de prata. As análises quantitativas foram realizadas em relação à banda da β-actina (*sence*: 5'-GCT ATC CAG AAA ACC CCT CA 3' e *antisense*: 5'- GCG GGT GGA ACT GTG TTA C-3')

4.6. Estimulação antigênica tecidual *in vitro*

Fragmentos da hipoderme dorsal provenientes de animais sensibilizados foram removidos, lavados em líquido nutritivo de Tyrode, colocados em placa de 24 poços e posteriormente incubados com OVA (300 µg/ml) ou meio RPMI 1640 por 15 min em estufa de CO₂. O tratamento constitui da pré-incubação com EABv (10 ou 50 µg/mL). Em seguida, a placa foi centrifugada a 150 x g por 10 min e o sobrenadante recolhido para posterior quantificação de histamina liberada por espectrofluorimetria segundo Shore (1959). Os fragmentos de tecido foram colocados para secar em estufa (40 °C) para obtenção dos valores de peso seco (mg) (CARVALHO e col., 2006).

Para quantificação de histamina alíquotas 0,02 ml foram adicionadas a igual volume de ácido perclórico (HClO₄, 0,8 N) e centrifugado a 850 x g durante 10 minutos. Frações deste sobrenadante foram misturados seqüencialmente com ácido clorídrico (HCL, 0,1 N) hidróxio de sódio (NAOH, 0,8 N), o-ftaldialdeído (OPT, 0,1%) e ácido clorídrico (HCL, 3 N). As leituras foram feitas com auxílio de um espectrofluorímetro (360 nm e leitura a 450 nm).

4.7. Formação de granuloma por implante de algodão

Em condições assépticas e sob anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.) efetuou-se incisão longitudinal dorsal (1 cm) em cada animal e implantou-se, mediante divulsão do tecido subcutâneo, um disco de algodão branco pesando 10 mg. Os discos de algodão foram previamente esterilizados por autoclavagem em lotes de dez unidades, e, imediatamente antes do implante, foram tratados com 0,4 mL de solução aquosa de penicilina a 5%. O tratamento com o EABv (10 mg/kg, i.p.), salina ou dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi iniciado no dia seguinte e mantido durante sete dias consecutivos. No 8º dia, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o tecido granulomatoso removido e seco a 37 °C por 6 horas para posterior pesagem. Em seguida, foi determinado a massa bruta em balança analítica, sendo a massa do granuloma calculada pela diferença entre a massa seca inicial (10 mg) e a massa final.

4.8. Avaliação da imunidade inespecífica

Para avaliação preliminar da imunidade inespecífica *in vivo* foi utilizado o modelo de formação de granuloma descrito anteriormente. Neste modelo, animais que receberam algodão no subcutâneo apresentaram no 8º dia após implante um intenso aumento no peso do linfonodo braquial. O tratamento com o EABv (10 mg/kg, i.p.), salina ou dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi iniciado no dia seguinte e mantido durante sete dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento, foram retirados os linfonodos braquiais de cada animal em seguida pesado e macerado em uma solução de PBS (1X) e EDTA (10 mM). As amostras foram recolhidas e diluídas (60X) em líquido de Türk para avaliar o número total de linfócitos através da contagem em câmara de Neubauer com auxílio do microscópio óptico. Animais operados e que não receberam implante (SHAM) foram usados como controle.

Em outro experimento, animais foram submetidos ao modelo de peritonite induzida por zimosan. O zimosan é uma preparação de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) que induz ao processo de fagocitose. A incorporação do zimosan pelos leucócitos é classificada como uma fagocitose não específica, sendo esta não-especificidade distinta da incorporação de antígenos mediada por receptores de superfície (CARVALHO e col., 2000). Neste modelo, animais receberam injeção de zimosan (2 mg, i.p.) diluída em salina estéril. Quatro horas após estímulo os animais foram sacrificados câmara de CO₂ e tiveram a cavidade peritoneal aberta, lavada com 3 mL de solução de PBS (1X) contendo EDTA (10 mM) e volume recuperado com o auxílio de pipeta automática para posterior análise de células totais em câmara de Neubauer. Para avaliar o índice de fagocitose de partículas de zimosan, foi preparado um citocentrifugado de alíquotas do lavado peritoneal corado pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Utilizando microscópio óptico foram contadas 100 células por lâmina analisando-se quantas células fagocitaram acima de 3 partículas de zimosan, representando a taxa de fagocitose. Os animais foram pré-tratados com EABv (10 mg/kg, i.p.) e o grupo controle recebeu salina 1 hora antes da injeção com zimosan.

4.9. Avaliação do perfil de toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi avaliada através da administração do extrato aquoso por via i.p. no volume de 0,2 mL/cavidade durante 7 dias na dose de 100 mg/kg. Os parâmetros observados diariamente neste período foram: morte, variações de peso, variação comportamental, contagem total de leucócitos no sangue e medula. A análise diferencial das células do sangue foi realizada por esfregaço corado segundo May-Grunwald-Giemsa, enquanto análise diferencial da medula foi realizada em citocentrifugados corados pelo mesmo método. Foram contados os neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos em um total de 100 células por lâmina. O grupo controle foi tratado por via i.p. com mesmo volume de salina.

5. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do teste de análise de variância do teste t (ANOVA), seguido do teste estatístico one-way de Newman-Keuls-Student. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM.) de no mínimo 6 animais, onde os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

1. Análise da atividade antinociceptiva do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* (EABv)

1.1. Efeito do EABv na nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético

A contorção abdominal observada após a injeção do ácido acético ocorre devido à irritação química na cavidade peritoneal. Embora seja um modelo de nocicepção de fácil execução, ele permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central como a morfina, quanto periférico como os AINES (SHINDE e col., 1999). Por se tratar de um método de fácil execução, econômico e que fornece resultados rápidos, este modelo foi o primeiro passo no estudo da atividade antinociceptiva do EABv.

Conforme apresentado na tabela 1, o pré-tratamento dos animais por 1 hora com EABv (50, 100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) foi capaz de produzir uma inibição significativa das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético nas doses de 200 e 400 mg/kg, representando uma redução, quando comparado ao grupo controle, de 61,4 % e 74,0 %, respectivamente. De modo semelhante, a indometacina (20 mg/kg, v.o.) apresentou inibição de 84,9 %.

Com propósito de avaliar um possível envolvimento do sistema opióide sobre a antinocicepção induzida pelo EABv, os animais receberam um tratamento prévio com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 30 min antes da administração do extrato (400 mg/kg, v.o.). O resultado mostrou que o pré-tratamento com naloxona não reverteu o efeito do EABv, sugerindo que o sistema opióide não esteja envolvidos nas ações antinociceptivas do EABv.

Tabela 1. Efeito do extrato aquoso de *B. virgilioides* na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de contorções	Inibição (%)
Controle	-	35,8 ± 3,2	-
	50	34,0 ± 4,5	5,0
EABv	100	25,3 ± 3,9	29,3
	200	13,8 ± 4,5 **	61,4
	400	9,3 ± 4,1 ***	74,0
Indometacina	20	5,4 ± 3,6 ***	84,9
Naloxona + EABv	5 + 400	10,8 ± 3,6 ***	69,8

Grupo controle recebeu solução salina como tratamento. O EABv nas diferentes doses foi administrado por via oral 1 h antes do ácido acético. Naloxona (5 mg/kg, i.p.) foi injetado 30 min antes do EABv. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6). As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. **P<0,01 e ***P<0,001.

Buscando avaliar a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo EABv, os animais foram submetidos ao estímulo álgico com ácido acético em diferentes tempos (30, 60, 120, 240 e 480 min) após tratamento com extrato. Como mostrado na figura 1, o tratamento com EABv (200 mg/kg, v.o.) revelou um efeito antinociceptivo já em 30 min, mostrando-se máximo em 60 min e mantendo-se assim por no mínimo até 4 h após estímulo. No tempo de 8 h após o estímulo álgico o extrato não foi capaz de apresentar efeito antinociceptivo.

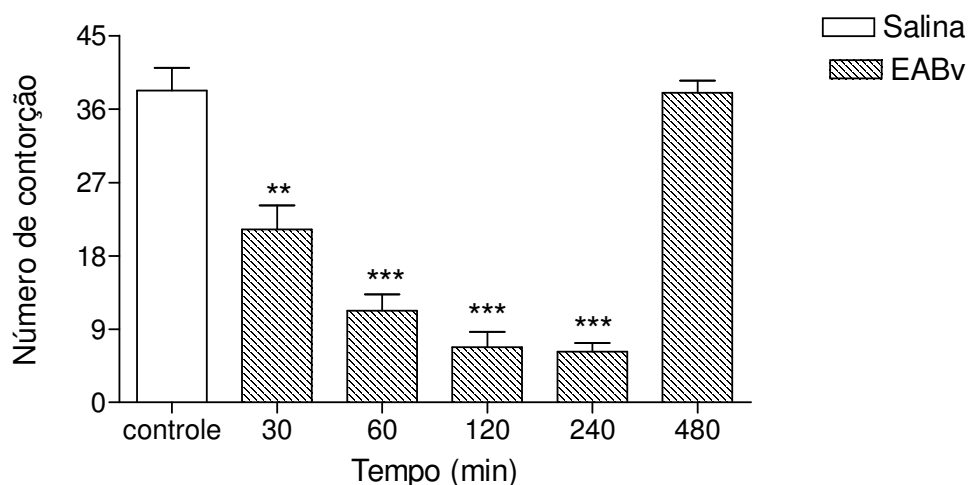


Figura 1. Duração do efeito antinociceptivo do EABv. O número de contorções abdominais foi registrado em diferentes intervalos de tempo após tratamento com extrato (200 mg/kg, v.o.). Animais controles receberam tratamento com salina. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) denota nível de significância comparado ao grupo controle. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Interessados em saber se a propriedade antinociceptiva do EABv permanecia presente ao longo do ano, cascas foram coletadas em diferentes meses (março, junho, setembro e dezembro) para que fosse feito o extrato aquoso. Conforme apresentado na tabela 2, podemos observar que apenas nas doses de 200 e 400 mg/kg houve atividade antinociceptiva diferente estatisticamente do respectivo grupo controle, indicando que o perfil de resposta não variou quando os extratos foram feitos com cascas coletadas em diferentes meses ao longo do ano.

Tabela 2. Efeito da sazonalidade no efeito antinociceptivo do extrato aquoso de *B. virgilioides* na contorção induzida por ácido acético em camundongos.

Mês do Ano	Grupos				
	Controle	EABv (mg/kg, v.o.)			
		50	100	200	400
Março	34,6 ± 3,0	31,2 ± 3,5	24,2 ± 3,6	12,9 ± 4,2**	9,6 ± 3,6***
Junho	34,4 ± 2,8	32,0 ± 2,1	23,8 ± 3,2	18,0 ± 6,4**	12,6 ± 3,4***
Setembro	32,3 ± 3,4	30,1 ± 3,2	25,3 ± 2,1	19,7 ± 2,3**	10,3 ± 4,2***
Dezembro	33,6 ± 3,3	30,8 ± 2,1	22,4 ± 2,8	14,5 ± 3,5**	11,2 ± 3,8***

O EABv ou salina foram administrados por via oral 1 h antes do ácido acético. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6). As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. (*) denota nível de significância comparado ao respectivo grupo controle. **P<0,01 e ***P<0,001

1.2. Efeito do EABv na nociceção induzida pela placa quente

Realizou-se o teste da placa quente para avaliar a reação nociceptiva em resposta ao estímulo térmico manifestada por reflexo de retirada de pata. Como parâmetro avaliado, observou-se o tempo (em segundos) que o animal apresentou comportamento típico (saltar ou lamber uma das patas posteriores) como resposta nociva. Como apresentado na figura 2, os animais pré-tratados com EABv (400 mg/kg, v.o.) não apresentaram diferença significativa no tempo latência quando comparado ao grupo de animais tratados com salina (0,9% NaCl) até 8 h após tratamento. Entretanto, o grupo tratado com morfina (5 mg/kg, i.p.) revelou um aumento significativo no tempo de latência que iniciou em 30 min e permaneceu por até 480 min.

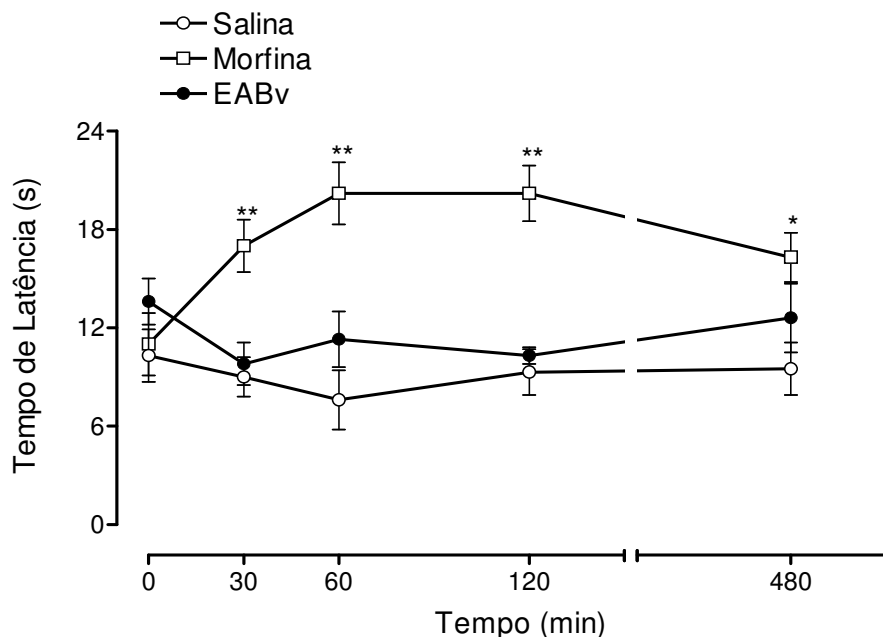


Figura 2. Efeito do EABv no modelo de placa quente. A resposta foi analisada nos tempos de 0, 30, 60, 120 e 480 min após administração de salina, AEBv (400 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.). Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) denota nível de significância comparado ao grupo salina. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

1.3. Efeito do EABv na nociceção induzida pela formalina

Como mostrado na figura 3, o tratamento por via oral com o EABv (200 mg/kg) não foi capaz de interferir com a resposta nociceptiva na fase neurogênica (0 a 5 min). Entretanto, este mesmo tratamento foi capaz de inibir de maneira significativa a nociceção na fase inflamatória (15 a 30 min) induzida por formalina, sendo esta inibição de aproximadamente 58 % quando comparado ao controle tratado com salina. Vale destacar que os animais que receberam indometacina (20 mg/kg, v.o.) também apresentaram perfil de ação semelhante ao extrato neste teste, ou seja, animais tratados com indometacina não exibiram alteração significativa da resposta nociceptiva na fase neurogênica (0 a 5 min), porém a dor inflamatória (15 a 30 min) foi completamente suprimida.

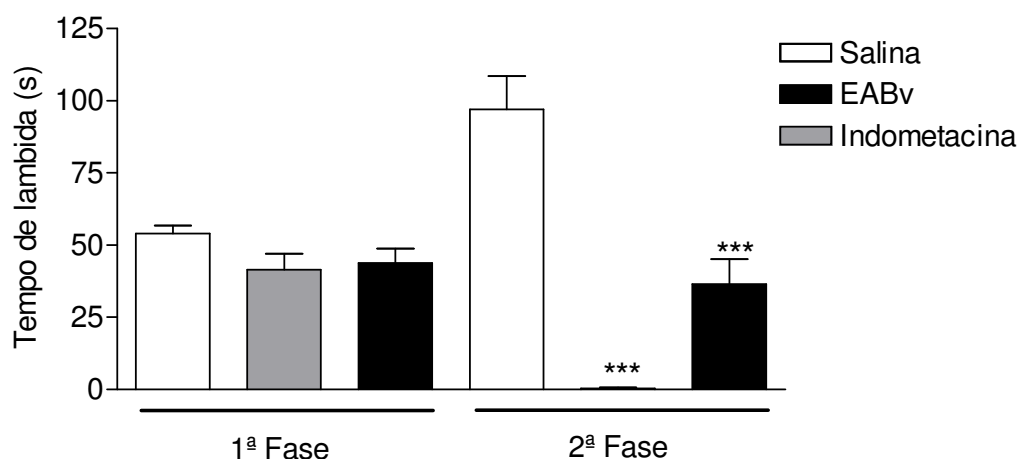


Figura 3. Efeito do tratamento com EABv sobre a nociceção induzida por formalina. Os animais foram tratados por via oral com EABv (200 mg/kg), salina ou indometacina (20 mg/kg) e a nociceção medida de 0-5 min (na primeira fase) e de 15-30 min (na segunda fase) após a injeção i.pl. de formalina. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) denota nível de significância comparado ao grupo salina da respectiva fase. *** $P < 0,001$.

1.4. Efeito do EABv por v.o. ou i.p. na nocicepção induzida por ácido acético

Como apresentado na figura 4, comparamos o efeito antinociceptivo do EABv quando administrado por via oral ou intraperitoneal no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Para isso, os animais foram tratados com EABv em diferentes doses no tempo de 1 hora antes da injeção com estímulo álgico. Quando o EABv foi administrado por via oral apenas as doses de 200 e 400 mg/kg foram capazes de inibir as contorções abdominais de modo significativo. No entanto, o extrato por via i.p. apresentou a partir da dose 10 mg/kg uma supressão dose dependente na resposta nociceptiva induzida por ácido acético. Os grupos controles foram injetados por via i.p. com salina ou indometacina (20 mg/kg). De maneira semelhante ao observado anteriormente, o tratamento com indometacina foi capaz de inibir de maneira significativa a nocicepção induzida por ácido acético quando comparado ao controle tratado com salina.

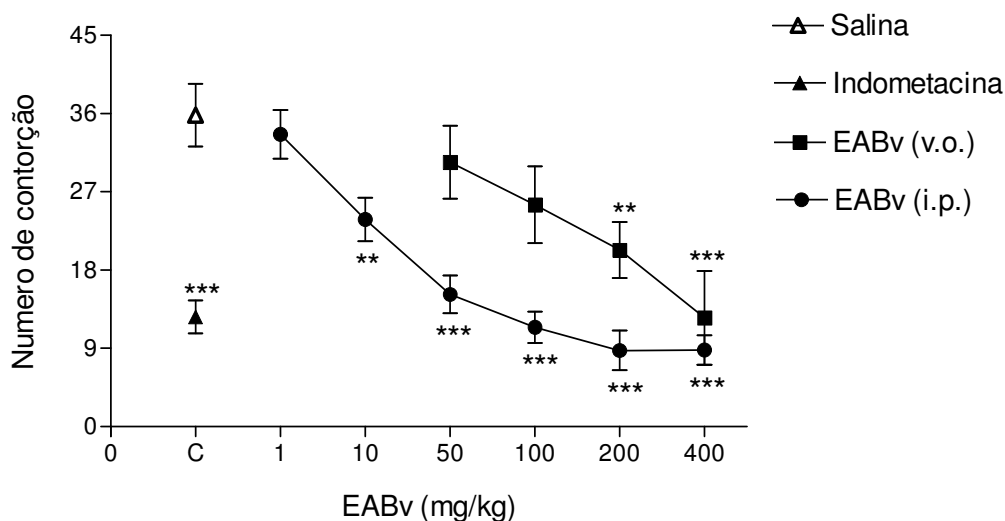


Figura 4. Efeito antinociceptivo do EABv quando administrado por v.o. ou i.p. no modelo de contorção induzido por ácido acético. Animais controles receberam tratamento com salina ou indometacina (20 mg/kg, i.p.). Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) denota nível de significância comparado ao grupo salina. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

2. Análise da atividade antiinflamatória do extrato aquoso bruto da casca de *Bowdichia virgilioides* (EABv)

2.1. Efeito do EABv na inflamação induzida por carragenina

Com propósito de avaliar o efeito do EABv sobre o processo inflamatório, utilizamos inicialmente o modelo de pleurisia induzida por carragenina. Neste modelo, verificamos inicialmente que os animais estimulados com carragenina (1%) exibiram um aumento na exsudação plasmática para o espaço pleural quando comparado ao grupo controle injetado com salina (figura 5A). Entretanto, o pré-tratamento com EABv (10 mg/kg, i.p.) mostrou-se ineficaz em inibir o extravasamento de proteína no tempo de 4 h após injeção de carragenina (figura 5A). A dexametasona (1 mg/kg, i.p.) injetada 1 h antes do estímulo inflamatório foi capaz de suprimir o extravasamento protéico induzido por carragenina.

Neste mesmo experimento, verificamos que a injeção intratorácica de carragenina induziu, no tempo de 4 h, um aumento significativo no acúmulo de neutrófilos para o espaço pleural quando comparado ao grupo injetado com salina (Figura 5B), sendo esta neutrofilia inibida pelo tratamento prévio com EABv (10 mg/kg, i.p.). Além disso, cabe destacar que administração de dexametasona (1 mg/kg, i.p.) suprimiu o acúmulo de neutrófilos induzidos por carragenina (Figura 5B).

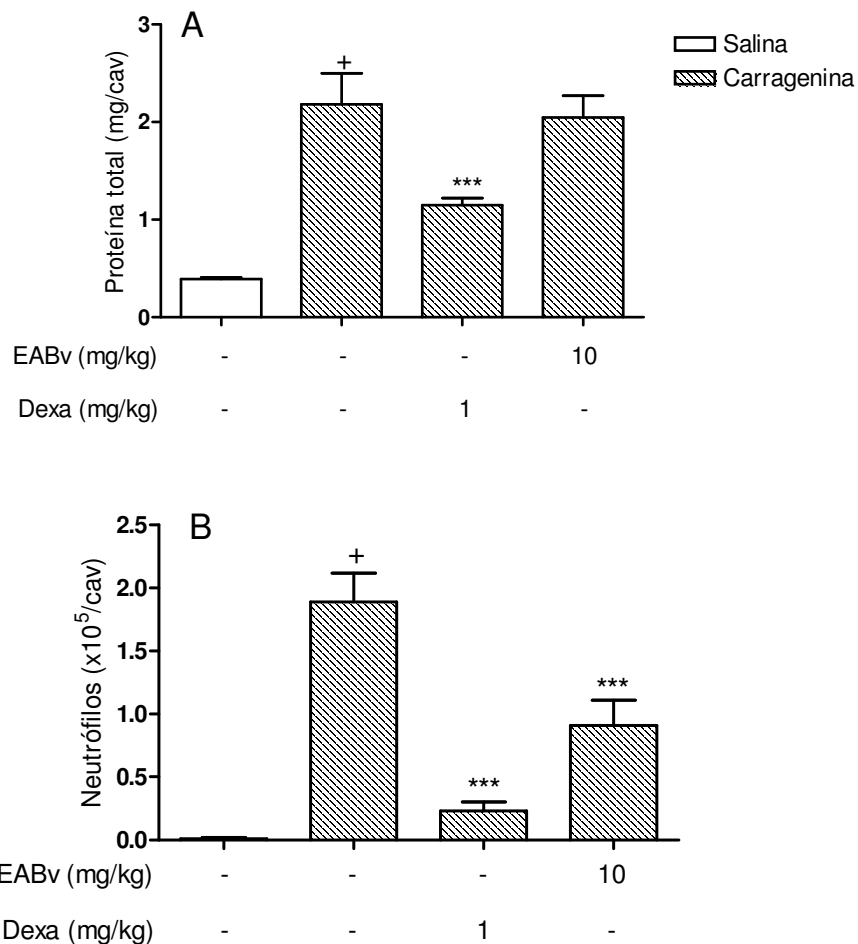


Figura 5. Efeito do EABv sobre a pleurisia induzida por carragenina. Os animais foram injetados com salina ou carragenina (1 %, i.t.) e sacrificados após 4 h. O gráfico A representa o acúmulo total de proteína na cavidade pleural e B representa o total de neutrófilos recrutados para cavidade após injeção com carragenina. Dexa representa animais pré-tratados com dexametasona (1mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. $^+P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo salina. $^{***}P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo carragenina.

2.2. Efeito do EABv na inflamação induzida por antígeno

Dando continuidade ao trabalho, avaliamos a atividade do EABv sobre a inflamação alérgica pleural. Neste modelo, os camundongos foram ativamente sensibilizados e 14 dias após, desafiados intratoracicamente com OVA (12 µg/cavidade). No grupo controle os animais sensibilizados foram desafiados com salina estéril. Como apresentado na figura 6, os animais sensibilizados que receberam OVA apresentaram um intenso acúmulo de proteína na cavidade em 30 min quando comparado ao grupo controle estimulado com salina. Verificamos que o tratamento prévio com EABv (10 mg/kg, i.p.) foi capaz de inibir de modo significativo o extravasamento plasmático (Figura 6). Nós notamos também que a dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de produzir uma inibição do acúmulo de proteína induzido por antígeno.

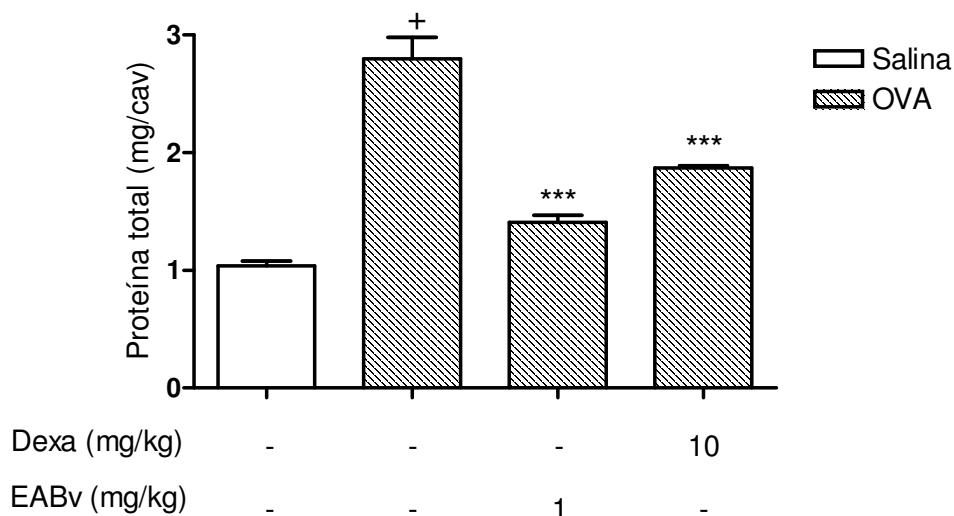


Figura 6. Efeito do EABv sobre o acúmulo de proteína induzida por antígeno em animais sensibilizados. Os animais foram sensibilizados e após 14 dias desafiados com OVA (12 µg, i.t.). Após 30 min do estímulo, o lavado pleural foi recolhido e alíquotas foram retiradas para dosagem de proteína. Dexa representa animais pré-tratados com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo. Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. *P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. ***P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com OVA.

Com propósito de caracterizar o efeito do EABv sobre a desgranulação de mástocito, fragmentos da hipoderme dorsal de camundongos sensibilizados foram incubados por 1 h com EABv (10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e estimulados antígenicamente para avaliar a influência deste extrato sobre a liberação de histamina *in vitro*. Como demonstrado na figura 7, após o tempo de 15 min de contato com antígeno (OVA, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) os fragmentos da hipoderme de animais ativamente sensibilizados promoveram uma intensa liberação de histamina quando comparados com o grupo controle estimulado com veículo. Quando a hipoderme de animais sensibilizados foram pré-incubadas com EABv (10 ou 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi observado uma inibição significativa à estimulação mostrada pela inibição completa na capacidade de liberar histamina após ativação antigênica.

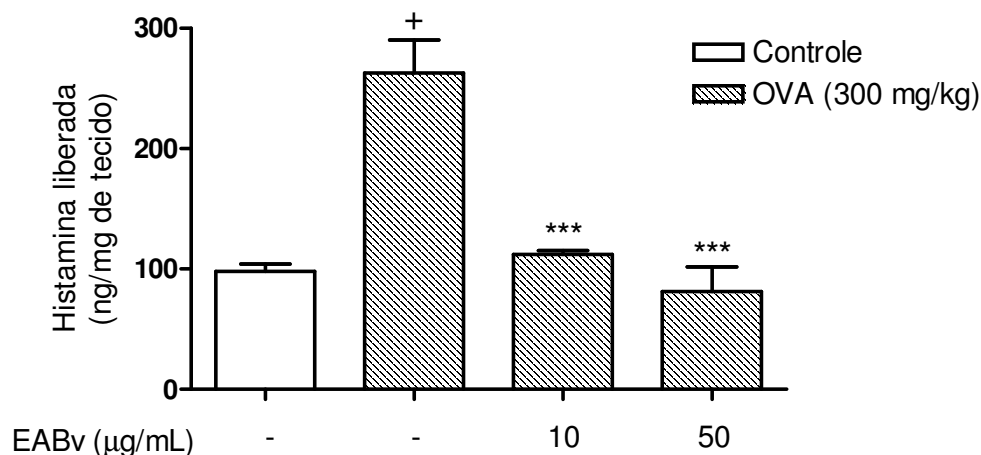


Figura 7. Efeito do EABv sobre a liberação de histamina em fragmentos de tecido de animais sensibilizados. Todos os animais utilizados neste experimento foram ativamente sensibilizados e tiveram seus tecidos isolados para estimulação *in vitro* por 15 min com veículo (RPMI) ou antígeno (OVA, 300 mg/mL). Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. * $P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo controle. *** $P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com antígeno (OVA).

Com propósito de avaliar a influência do EABv sobre o recrutamento de eosinófilos, animais tratados com EABv foram submetidos ao desafio antigênico no modelo de pleurisia alérgica (SILVA e col., 2001). Neste modelo observou-se que o estímulo com OVA (12 µg/cavidade) foi capaz de induzir um significativo acúmulo de eosinófilos no espaço pleural quando comparado ao grupo estimulado com salina (Figura 8). O tratamento prévio com EABv (10 mg/kg, i.p.) inibiu de modo significativo a eosinofilia para esta cavidade após estímulo. Além disso, cabe destacar que o pré-tratamento com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de suprimir o recrutamento de eosinófilos induzidos por antígeno (Figura 8).

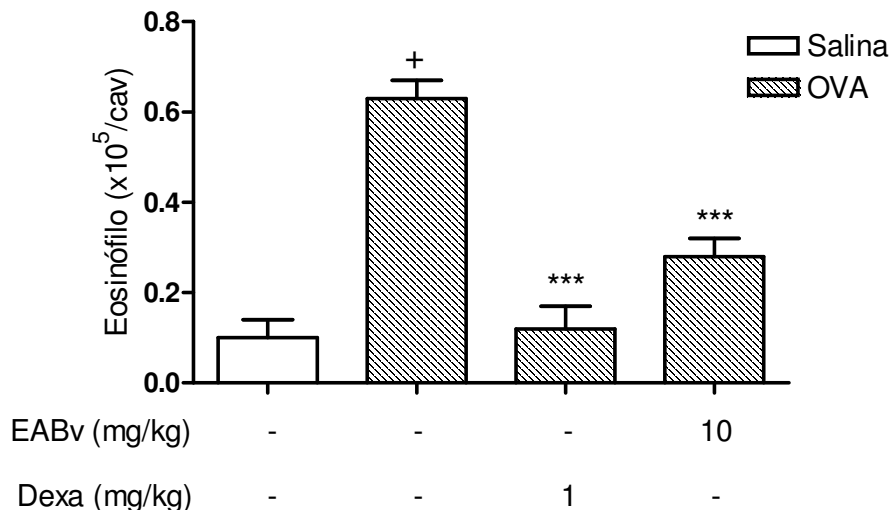


Figura 8. Efeito do EABv sobre a eosinofilia induzida por antígeno em animais sensibilizados. Os animais sensibilizados foram injetados com OVA (12 µg/cavidade) e sacrificados após 24 h. Animais foram pré-tratados com dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, i.p.) 1 h antes do desafio pleural. Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. ^{***}P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com OVA.

Para avaliar o possível mecanismo pelo qual o EABv foi capaz de promover a inibição do recrutamento eosinofílico, animais sensibilizados e desafiados com OVA (12 µg/cavidade) foram sacrificados após 6 h do estímulo antigênico para determinar o conteúdo relativo de RNA mensageiro (RNAm) das citocinas IL-5 e CCL11 expresso nos leucócitos pleurais. Neste experimento, verificamos que o desafio antigênico induziu um aumento significativo na expressão relativa de IL-5 (figura 9A) e CCL11 (figura 9B) nos leucócitos presentes no espaço pleural quando comparado ao grupo estimulado com salina. O tratamento prévio por 1 hora com EABv (10 mg/kg, i.p.) inibiu de modo significativo a expressão de RNAm para IL-5 (figura 9A) e CCL11 (figura 9B). De maneira semelhante, dexametasona (1 mg/kg, i.p.) foi também capaz de suprimir a expressão de RNAm para IL-5 e CCL11 (figura 9).

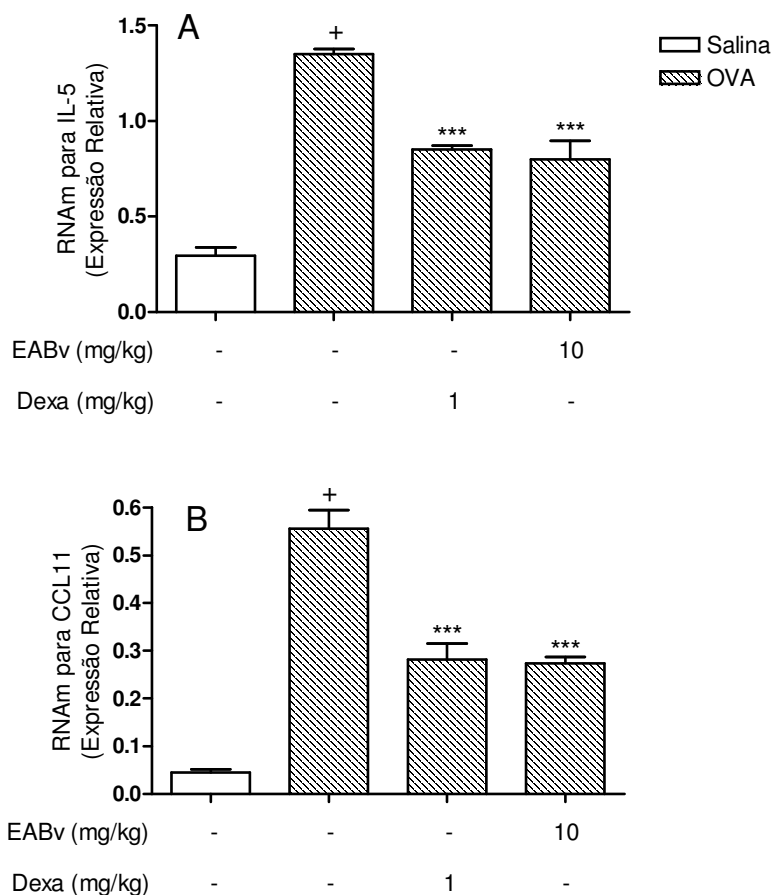


Figura 9. Efeito do EABv sobre a expressão de RNAm nos leucócitos. Animais sensibilizados foram injetados com OVA e sacrificados após 6 h. O RNAm foi isolado das células para avaliar a expressão gênica de IL-5 (A) e CCL11 (B). Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com

ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina. ^{***}P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com OVA.

2.3. Efeito do EABv no modelo de inflamação crônica induzido por implante de algodão

O implante do algodão na região subcutânea dos animais induziu a formação do tecido granulomatoso, observado em todos os grupos no final do sétimo dia, sendo que, no grupo controle tratado com salina, esta formação foi mais expressiva. A administração diária de EABv (10 mg/kg, i.p.) por 7 dias, inibiu de forma significativa a formação do tecido granulomatoso em 36,5 %, enquanto que no grupo tratado com dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, i.p.) a inibição foi de 47% (figura 10).

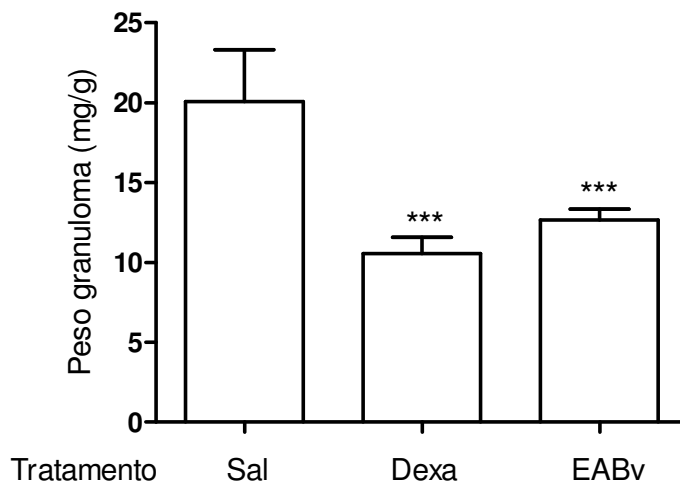


Figura 10. Efeito do tratamento com EABv (10 mg/kg, i.p.) durante 7 dias sobre a formação do tecido granulomatoso. Os animais controles foram tratados com solução salina (Sal) ou Dexametasona (Dexa, 1mg/kg, i.p.) por igual período. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. *** $P < 0,001$ denota nível de significância comparado ao grupo salina.

2.4. Efeito do EABv sobre a resposta imune inespecífica *in vivo*

Para avaliar a possível influência do EABv sobre a resposta imune inespecífica, o número de linfócitos foi avaliado nos linfonodos braquiais que drenam a região onde o algodão foi implantado. Como representado na figura 11A, o implante de algodão ocasionou um aumento significativo no peso relativo do linfonodo braquial quando comparado ao grupo falso operado (SHAM). O tratamento i.p. com EABv (10 mg/kg) ou dexametasona (Dexa, 1 mg/kg) por 7 dias consecutivos após implante promoveu uma inibição significativa na formação do tecido granulomatoso. Este fenômeno apresenta uma relação direta com o número de linfócitos presentes no linfonodo braquial, pois o implante de algodão proporcionou um aumento no número de linfócitos em relação ao grupo SHAM, e o tratamento com EABv ou Dexa foi capaz de prevenir este aumento (figura 11B).

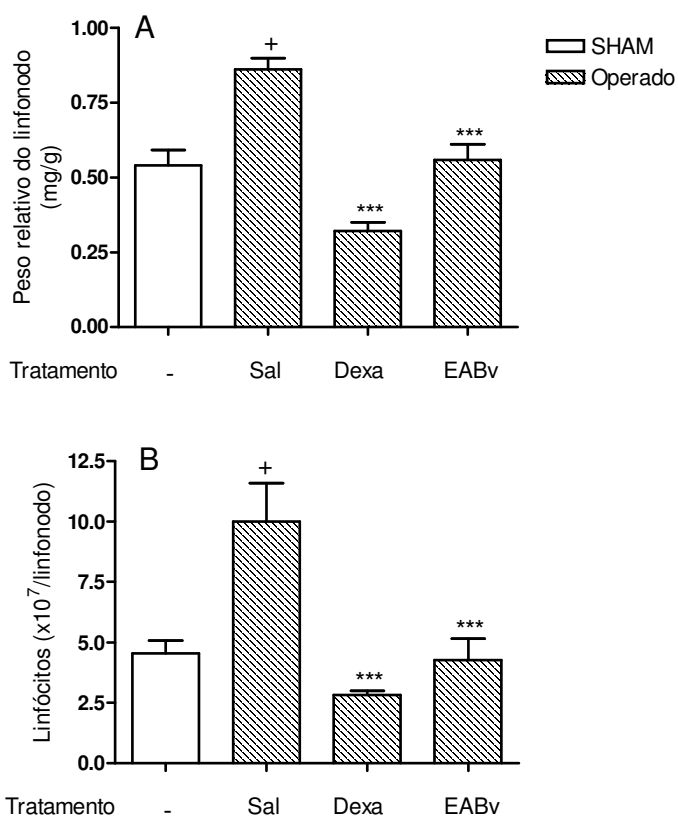


Figura 11. Efeito do tratamento com EABv (10 mg/kg, i.p.) durante 7 dias sobre a resposta proliferativa dos linfócitos *in vivo*. Em A, observa-se o peso relativo dos linfonodos. Em B, observa-se o número total de linfócitos presente nos linfonodos braquiais. Os animais controles foram tratados com solução salina (Sal) ou Dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, i.p.). Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As

diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ⁺P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo SHAM. ^{***}P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina.

Buscando dar continuidade à investigação da atividade imunomoduladora do EABv, utilizamos o modelo de peritonite induzida por zimosan (2 mg/cav). Neste experimento avaliamos a taxa de fagocitose pelos leucócitos *in vivo*. Conforme a figura 12A, o zimosan induziu um aumento drástico no recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal após 4 h, fenômeno que foi significativamente suprimido pelo pré-tratamento por 1 h com EABv (10 mg/kg, i.p.). Conforme exibido na figura 12B, análise do citocentrifugado preparado a partir do lavado peritoneal de animais estimulados com zimosan revelou que os leucócitos apresentaram um índice de fagocitose acima de 80% de partículas de zimosan, enquanto que animais submetidos ao tratamento com EABv exibiram uma significativa redução neste índice de fagocitose para aproximadamente 60%.

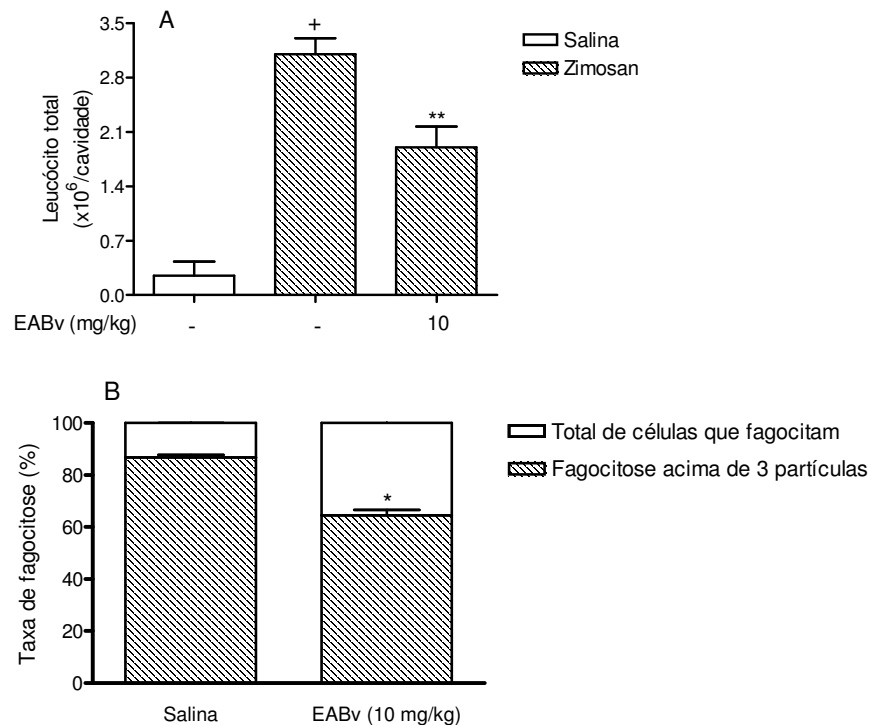


Figura 12. Efeito do EABv sobre a fagocitose *in vivo*. Em A, representa o influxo de leucócitos induzido pela injeção de zimosan. Em B, a taxa de fagocitose de zimosan por leucócitos provenientes de animais tratados com salina ou EABv. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. * $P < 0,001$ ou * $P < 0,05$ denota nível de significância comparado ao grupo salina. ** $P < 0,01$ denota nível de significância comparado ao grupo estimulado com zimosan.

3. Avaliação preliminar do potencial tóxico do EABv

Para avaliar o potencial tóxico do EABv, animais foram tratados com extrato por 7 dias consecutivos com a dose de 100 mg/kg (i.p.). Sob este tratamento, nenhuma morte foi observada e nenhuma alteração comportamental (ambientação, piloereção, socialização e mobilidade) foi detectada. Como observado na tabela 3, a administração EABv não interferiu com o ganho de peso dos animais durante o experimento. Além disso, sob esta mesma condição de tratamento, nenhuma alteração hematológica ou na celularidade da medula óssea foi detectada. Vale destacar que a análise macroscópica da mucosa estomacal e intestinal, rins, baço, pulmão e coração não revelaram nenhuma alteração visível sob condição de tratamento com extrato.

Tabela 3. Efeito do tratamento com EABv (100 mg/kg) não altera parâmetros celulares e peso corpóreo de camundongos.

Parâmetro	Grupo	Dia 1	Dia 8
Peso corpóreo	Salina	30,9 ± 0,86	31,7 ± 2,4
	EABv	32,0 ± 0,62	33,2 ± 0,5
Leucócito total do sangue (x10 ⁶ /mm ³)	Salina	8,4 ± 2,09	8,7 ± 2,1
	EABv	9,3 ± 0,81	9,2 ± 1,6
Leucócito total da medula (x10 ⁶ /fêmur)	Salina	20,4 ± 4,5	19,7 ± 4,4
	EABv	21,8 ± 3,4	22,0 ± 3,6

DISCUSSÃO

Compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes antiinflamatórios. Desta forma, a busca por novos fármacos que interfiram efetivamente com os processos inflamatórios é de grande importância (CALIXTO, e col., 2004).

Atualmente, várias doenças ainda permanecem com sua etiologia desconhecida ou apresentam múltiplos fatores que contribuem para a permanência da doença no organismo. Algumas dessas doenças podem apresentar um caráter inflamatório e/ou doloroso persistente, sendo tratadas com medicamentos do tipo AINES, corticosteróides ou opióides, na tentativa de melhorar a sintomatologia geral do paciente (GUPTA e DUBOIS, 2002). Assim, a descoberta de novas substâncias com atividade analgésica e/ou antiinflamatória é ainda um aspecto altamente desejável e de enorme importância para a utilização clínica. Várias evidências demonstram que um grande número de medicamentos utilizados terapêuticamente deriva direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas superiores, sendo esta uma fonte inesgotável de possibilidades para a descoberta de novas substâncias bioativas (KOEHN e CARTER, 2005). Entretanto, várias dificuldades são encontradas por aqueles que desejam estudar as ações das plantas medicinais em sistema biológico, como por exemplo, a escolha de modelos experimentais, obtenção de extratos padronizados, dificuldade de obtenção e isolamento e identificação das substâncias ativas. Além disso, muitas doenças estão associadas a múltiplos fatores, dificultando a escolha de um alvo específico para o estudo (COOKSON, 2004).

Dentre as várias famílias do reino vegetal com potencialidade de fornecer entidades químicas está à família Fabaceae. As fabaceas são compostas por inúmeros membros com vasto espectro de atividades biológicas, e que são largamente empregados na medicina popular para os mais variados fins (ROCHA e col., 1994). Nesta família encontra-se a espécie *B. virgilioides* que apesar de muito utilizada folcloricamente não há registro científico sobre suas ações analgésicas e/ou antiinflamatória.

Neste contexto, o trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o extrato aquoso da casca de *B. virgilioides* (EABv) apresentou além de ações antinociceptivas em modelos experimentais de dor, ações antiinflamatórias,

antialérgicas e imunomoduladora, sem apresentar efeitos tóxicos associados a seu uso.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que o EABv apresentou efeito antinociceptivo, o qual foi detectado em modelos de estudo baseados em estímulo nociceptivo químico, como a formalina e o ácido acético. Assim, a redução nas contorções abdominais induzidas por ácido acético, a não alteração no tempo de latência ao calor no teste da placa quente e a redução da resposta nociceptiva à formalina apenas na segunda fase do teste, sugerem que o EABv apresente importante efeito antinociceptivo estando de acordo com o efeito analgésico sugerido pelo uso popular.

Além disso, no teste das contorções abdominais, o tratamento com dose única de EABv produziu uma inibição que se iniciou em 30 min e se entendeu por no mínimo 4 h após estímulo álgico indicando um tempo de ação prolongado para um extrato bruto, tendo visto que outros AINES possui ação por um período de tempo semelhante neste mesmo modelo (SOUSA e col., 2004). Vale destacar que o extrato mantém seus efeitos antinociceptivos mesmo quando se compara as coletas das cascas em diferentes meses do ano, sugerindo que, para produção de substâncias com potencial analgésico, esta espécie vegetal não é sensível às variações sazonais.

Adicionalmente, o efeito analgésico do EABv parece ser decorrente de mecanismos que não dependem da ativação do sistema opióide uma vez que o efeito antinociceptivo não foi revertido pelo pré-tratamento com naloxona. Além disso, quando os animais tratados com EABv foram submetidos ao teste da placa quente, que é um teste utilizado para detecção de substâncias analgésicas com efeito central (ANKIER, 1974), verificamos que os animais permaneceram com o mesmo perfil de nocicepção térmica quando comparado ao grupo controle, indicando que os efeitos antinociceptivos do EABv parecem não decorrer de uma ação central. Portanto, com este perfil de ação antinociceptiva, periférica e de longa duração em dose única, o EABv apresenta-se com um bom perfil de ação analgésica, características semelhante aos fármacos analgésicos/antiinflamatórios não-esteróides (FARSAM e col., 2000). É possível que, assim como os AINES, componentes deste extrato estejam inibindo a biossíntese de prostaglandinas.

O teste da formalina permite diferenciar a dor neurogênica (1ª fase) da dor inflamatória (2ª fase) (ABBOTT e col., 1995). A primeira fase de nocicepção (5 minutos iniciais) decorre, em parte, do estímulo direto do formaldeído nos nociceptores, enquanto a segunda fase (15 a 30 minutos) é produzida pelos mediadores inflamatórios. O pré-tratamento com EABv resultou em diminuição da reatividade apenas na segunda fase de nocicepção, quando comparado ao grupo controle, resultado que sugere a participação de mecanismos antiinflamatórios no efeito analgésico do EABv. Adicionalmente, a ausência de inibição da primeira fase de nocicepção (dor neurogênica) e a não efetividade no teste da placa quente reforçam que os mecanismos determinantes da atividade antinociceptiva do EABv envolvem mecanismos antiinflamatórios de ação periférica.

O extrato é utilizado popularmente na sua forma aquosa ingerido como chá (solução de concentrações variadas preparadas por manipulação a partir do extrato bruto da planta), tópico sobre áreas de processos inflamatórios (traumáticos ou infecciosos) ou sobre feridas cutâneas. Verificamos que a administração oral do EABv não ocasionou a perda dos efeitos antinociceptivos, sugerindo que o(s) princípio(s) ativo(s) não sofre(m) alterações metabólicas hepáticas (conseqüência do efeito da primeira passagem) ou inativação pelas secreções da mucosa do sistema digestório. Entretanto, a administração intraperitoneal permitiu o uso de uma dose 20 vezes menor capaz de promover o mesmo efeito analgésico que a dose eficaz por via oral. Além disso, a via intraperitoneal tem a vantagem de apresentar uma rápida absorção proporcionando efeitos mais agudos (BENET e col., 1996)

Para confirmar a possível atividade antiinflamatória sugerida no teste da formalina, o EABv foi avaliado no modelo de pleurisia induzido por carragenina. A carragenina produz inflamação por estimular a liberação de mediadores, ocasionando a formação de edema e recrutamento celular, em especial neutrófilo (HENRIQUES e col., 1987). Foi observado que o EABv não foi capaz de prevenir o extravasamento plasmático para a cavidade pleural. Entretanto, a mesma dose se mostrou capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos.

Foi demonstrado que as respostas inflamatórias observadas tanto no modelo da formalina quanto na pleurisia envolvem fatores fortemente dependentes da ativação celular. Durante a inflamação pleural aguda por estímulo não-alérgico, as células mesoteliais e macrófagos são as principais responsáveis pela secreção de

mediadores que recrutam neutrófilos e células mononucleares (DAMAS & LIEGEOIS, 1999). A interferência do extrato no influxo de neutrófilo para cavidade pleural sugere que substâncias presentes nas cascas podem estar interferindo diretamente na resposta inflamatória celular, responsável pela liberação de mediadores capazes de mobilizar leucócitos para o sítio inflamado, tal como o TNF- α (CAILHIER e col., 2006). Além disso, não se pode descartar também um possível efeito direto do extrato sobre os neutrófilos.

Com intuito de avaliar se o efeito do EABv era extensivo a outros tipos de reações inflamatórias, submetemos o extrato ao modelo de pleurisia alérgica em camundongos. Neste modelo, verificamos que o EABv, de modo diferente ao que foi observado na carregenina, inibiu de maneira significativa a exsudação protéica induzida por antígeno em animais sensibilizados. Este resultado sugere a atuação do EABv em fenômenos relacionados a ativação de mastócitos, visto que tais células são capazes de liberar aminas vasoativas que atuam diretamente na formação do edema alérgico (BARRETO e col., 2003). Reforçando estes resultados, Lima e col. (1996) demonstraram que a depleção de mastócitos residentes na cavidade torácica foi capaz de promover a redução na formação do edema pleural induzido por antígeno.

Para investigar esse possível efeito sobre os mastócitos, fragmentos de tecido provenientes de animais sensibilizados ativamente foram estimulados *in vitro* com antígeno. Verificamos que o tratamento prévio destes tecidos com o EABv foi capaz de interferir diretamente com a liberação anafilática de histamina, indicando efeito sobre a desgranulação mastocitária.

Além disso, o tratamento dos animais alérgicos com o extrato antes do estímulo antigênico foi capaz de prevenir o influxo de eosinófilos para o espaço pleural, mostrando que EABv possui substâncias com importante atividade antiinflamatória neste modelo de inflamação alérgica. Os eosinófilos são células produzidas em quantidades significativas somente em situações específicas, tal como alergia. Mesmo ainda não estando completamente esclarecido todas as etapas responsáveis pela eosinofilia tecidual induzida pelo estímulo alérgico, sabe-se que algumas moléculas estão diretamente envolvidas no controle deste processo, tais como IL-5 e CCL11 (eotaxina) (SILVA e col., 2001). Portanto, com propósito de avaliar o possível envolvimento do EABv na inibição de produção

destas moléculas, avaliamos os níveis de expressão de RNAm destas proteínas na condição alérgica submetida ao tratamento com extrato. Assim, verificamos que o tratamento prévio com EABv foi capaz de suprimir a expressão destes genes relacionados ao ativação/recrutamento de eosinófilos. Sugerindo que este possa ser um dos mecanismos responsáveis pelo menor recrutamento de eosinófilos quando do tratamento com o extrato. Sustentando estes achados, diferentes autores relatam que a menor expressão de RNAm para IL-5 e CCL11 está diretamente relacionada com um menor influxo de eosinófilos para o sítio estimulado (EUM e col., 2005; SEHMI e col., 2003).

Com propósito de avaliar se o efeito antiinflamatório do EABv em situações de inflamação crônica, foi investigado o efeito deste extrato sobre a formação do granuloma induzido por implante de algodão. Neste modelo, verificamos que animais que receberam o implante e foram tratados com o extrato exibiram uma drástica inibição na formação do tecido granulomatoso. Dessa forma, podemos sugerir que o EABv mostra-se capaz de inibir parâmetros inflamatórios agudos e resposta inflamatória de longa duração. Neste modelo, substâncias capazes de suprimir a ação/produção de mediadores pró-angiogênicos mostram-se eficazes em bloquear a formação do tecido granulomatoso (SWINGLE e SHIDEMAN, 1972), sendo possível a inibição de alguns desses mediadores pelo extrato.

Neste mesmo modelo, a presença do estímulo não-imunogênico foi capaz de induzir, além de uma marcada reação inflamatória local, um expressivo aumento no peso dos linfonodos braquiais, indicando que esta alteração mostra-se relacionado com a função imunológica. Assim, animais que receberam implante e foram submetidos ao tratamento com EABv exibiram uma drástica redução no tamanho dos linfonodos, fenômeno que mostrou-se associado com o menor número de linfócitos totais neste órgão linfóide. Revelando que além do efeito antiinflamatório o EABv também apresenta ações imunomoduladoras.

Utilizando o modelo de peritonite induzida por zimosan, estendemos nossas análises para avaliar o possível efeito do EABv sobre a resposta imune inata, representada pelo modelo de fagocitose *in vivo*. Inicialmente verificamos que a injeção de zimosan proporcionou um drástico aumento nos leucócitos para o sítio estimulado, e que o tratamento com EABv mostrou-se eficaz em inibir esta leucocitose. Além disso, observamos também que leucócitos provenientes de

animais tratados com extrato exibiram uma importante redução na taxa de fagocitose de partículas de zimosan, fenômeno que sustenta um possível efeito imunomodulador do extrato.

Com propósito de avaliar possíveis ações tóxicas associadas ao uso contínuo do EABv, os animais foram submetidos ao tratamento, por uma semana, com extrato em uma dose dez vezes acima daquela responsável por causar os efeitos antinociceptivos, antiinflamatórios e imunossupressores. Durante este tratamento, não foram observados sinais de toxicidade e nenhuma morte foi registrada. Além disso, não se detectou nenhuma modificação no perfil hematológico, nem mesmo na celularidade da medula óssea. Em adição, a análise macroscópica de diferentes órgãos examinados apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade. Assim, estes resultados sugerem que o uso do EABv não foi capaz de promover efeitos tóxicos sobre os parâmetros analisados.

CONCLUSÃO

- O extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* foi capaz de apresentar importante atividade analgésica por um período de no mínimo 4 h após sua administração, fenômeno que parece estar relacionado a uma ação periférica e independe do sistema opióide.
- O efeito analgésico do extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* não foi alterado quando preparado com cascas coletadas ao longo do ano, indicando que a(s) substância(s) responsável(is) por este efeito biológico não sofrem influência sazonal.
- Nos modelos de inflamação não-alérgica o extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* mostrou-se capaz de inibir apenas o recrutamento leucocitário.
- Na inflamação alérgica, pleurisia induzida por ovoalbumina, o extrato inibiu não apenas o edema anafilático, mas também o influxo de eosinófilos por um mecanismo que parece depender da produção de proteínas eosinofílicas IL-5 e CCL11.
- No modelo de liberação de histamina *in vitro*, o extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* mostrou-se capaz de atuar diretamente sobre a desgranulação de mastócitos.
- No modelo de inflamação crônica, granuloma induzido por implante de algodão, o extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* mostrou-se capaz de inibir tanto a formação do granuloma quanto a resposta linfoproliferativa.
- O extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* foi capaz de inibir a resposta imune inata revelada pela redução na taxa de fagocitose de partículas de zimosan pelos leucócitos.
- O tratamento com extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* não foi capaz de revelar nenhum efeito tóxico associado ao seu uso.
- O conjunto de resultados obtidos neste estudo sustenta o uso popular do extrato aquoso da casca de *Bowdichia virgilioides* tendo por base seus efeitos analgésicos, antiinflamatórios, antialérgicos e imunossupressores, associada a uma baixa toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phase of the pain responses in rats. **Pain** 60: 91-102, 1995.

ADCOCK, I.M.; ITO, K.. Glucocorticoid pathways in chronic obstructive pulmonary disease therapy. **Proc Am Thorac Soc** 2: 313-319, 2005.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: **Embrapa-CPAC**, 1998. 464p.

ALMEIDA T. F; ROIZENBLATT, S. and TUFIK, S. Afferent pain pathways: neuroanatomical review. **Brain Research** 100: 40-56. 2004.

ANKIER SI. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur J Pharmacol.** 27: 1-4, 1974.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci.** 14: 436-441. 1993

BARRETO, E.O.; CARVALHO, V.F.; DIAZ, B.L.; BALDUINO, A.; CORDEIRO, R.S.B.; MARTINS M.A.; SILVA, P.M.R. Adoptive transfer of mast cells abolishes the inflammatory refractoriness to allergen in diabetic rats. **Int Archives Allergy Immunol** 131: 212-220, 2003.

BENET, L.Z.; KROETZ, D.L.; SHEINER, L.B. "Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination". In: Molinoff PB, Ruddon RW editors. The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill; 1996.

BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet.** 353: 1610-1615. 1999.

BESSION, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs.** 53, 1997

BORRIS RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **J Ethnopharmacol.** 51: 29-38, 1996.

BURIAN M, GEISLINGER G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacol Ther.** 107:139-154, 2005.

CAILHIER, J.F.; SAWATZKY, D.A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R.A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J. and HUGHES, J. Resident Pleural Macrophages Are Key Orchestrators of Neutrophil Recruitment in Pleural Inflammation. **Am J Resp Critial Care Med**, 173: 540-547, 2006.

CALIXTO JB, SANTOS AR, CECHINEL-FILHO V, YUNES RA. A review of the plants of the genus Phyllanthus: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. **Med Res Rev.** 18: 225-258, 1998

CALIXTO, J. B. BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturrally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res.** 14: 401-418. 2000.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origen. Parte II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.** 69: 973-985. 2003.

CALIXTO JB, CAMPOS MM, OTUKI MF, SANTOS AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med** 70: 93-103, 2004

CARVALHO, M.D.T.; TOBIAS, V.E.; VENDRAME, C.M.V.; SHIMAKURRO, A.F.M.; GIDLUND, M.; QUINTÃO, E.C.R. Zymosan phagocytosis by mouse peritoneal macrophage is increased by apoHDL-and not by intact HDL-covered particles. **Braz J Med Biol Res**, 33(3): 313-316, 2000.

CARVALHO, V.F.; BARRETO E.O.; SERRA M.F.; CORDEIRO R.S.; MARTINS M.A.; FORTES Z.B.; SILVA P.M. Aldose reductase inhibitor zopolrestat restores allergic hyporesponsiveness in alloxan-diabetic rats. **Eur J Pharmacol** 549: 173-178, 2006.

COOKSON, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **Nature Rev Immunol**, 4: 978-988, 2004.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2000.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE-BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine** 102: 1755-1760, 2005

DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. Naunyn-Schmiedeberg's. **Arch Pharmacol**, 359: 220-227, 1999

DI STASI, L.C. (Org). Plantas Mediciniais: Arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP; 232 p, 1996.

El Alwani M, Wu BX, Obeid LM, Hannun YA. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol Ther**. 112: 171-183, 2006

EUM, S.Y.; MAGHNI, K.; TOLLOCZKO, B.; EIDELMAN, D.H.; MARTIN, J.G. IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 288: L576-84, 2005

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A.R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. **J Ethnopharmacol** 71: 443-447, 2000.

FLOWER, R.J.; ROTHWELL, N.J. Lipocortin-1: Cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol**. 15: 71-76. 1994;

FÜRST, S. Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bulletin**, 48, n.2, 129-141. 1999

GILBERT AK, HOSZTAFI S, MAHURTER L, PASTERNAK GW. Pharmacological characterization of dihydromorphine, 6-acetyldihydromorphine and dihydroheroin

analgesia and their differentiation from morphine. **Eur J Pharmacol.** 492: 123-130, 2004.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: New opportunities for drug discovery. **Nature Rev** 5: 401-416, 2004

GONZALEZ-REY E, CHORNY A, DEL MORAL RG, VARELA N, DELGADO M. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. **Ann Rheum Dis.** 2007 66: 582-588, 2007

GUPTA RA, DUBOIS RN. Cyclooxygenase-2 inhibitor therapy for the prevention of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. **J Natl Cancer Inst.** 94: 406-407, 2002.

HAWKEY CJ. COX-2 chronology. **Gut.** 54: 1509-1514, 2005.

HENSSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunol** 6: 1179-1181, 2005.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J. and CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res** 20: 243 – 249, 1987

HEYWOOD, V.H. Patterns, extents and modes of invasions by terrestrial plants. In: Drake, J.A.; Mooney, H.A.; Di Castri, F.; Groves, R. H.; Kruger, F.J.; Rejmánek, M.; Williamson, M. Biological invasions. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 31-51.

HUA, X.Y.; BACK, S.M. and TAM, E.K.. Substance P enhances electrical field stimulation-induced mast cell degranulation in rat trachea. **Am J Physiol.** 270: L985-991, 1996.

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

JOSS, R.A. and GEBBERS J. O. Mediastinal mass with fever and night sweats in a young farmer--potential pitfalls in the diagnostic work-up and treatment. **Ann Oncol.** 4: 781-784. 1993.

JULIUS, D. and BASBAUM, A.L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210, 2001.

KATO T, INUZUKA L, KONDO M, MATSUDA T. Growth of nisin-producing lactococci in cooked rice supplemented with soybean extract and its application to inhibition of *Bacillus subtilis* in rice miso. **Biosci Biotechnol Biochem.** 65: 330-337, 2001.

KELLY, J.B. and PAYNE, R. Pain syndromes in the cancer patient. **Neurol Clin.** 9: 937-953. 1991

KOEHN FE, CARTER GT. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** 4: 206-220, 2005

KUMAR VL, SINGHAL A. Germinating seeds of the mung bean, *Vigna radiata* (Fabaceae), as a model for the preliminary evaluation of cytotoxic effects of drugs. **Biocell.** 2009 33:19-24, 2009

LIMA MC, CHAGAS MS, SILVA PM, CALHEIROS AS, PROUVOST-DANON A, FARIAS-NETO HC, CORDEIRO RS, MARTINS MA. Histamine-potentiating activity in rat anaphylactic pleural fluid: role of serotonin. **Braz J Med Biol Res.** 1996 29: 1049-1056.

MATOS ME, ALMEIDA FR, RAO VS. Inhibition of formaldehyde-induced arthritis by a purified fraction prepared from *Wilbrandia* (cf) *verticillata* which contains novel norcucurbitacin glucosides. **Braz J Med Biol Res** 22: 1397-1399, 1989

MATSUNO Y, DEGUCHI J, HIRASAWA Y, OHYAMA K, TOYODA H, HIROBE C, EKASARI W, WIDYAWARUYANTI A, ZAINI NC, MORITA H. Sucutiniranes A and B, new cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*. **Bioorg Med Chem Lett.** 18: 3774-3777, 2008

MATSUNO Y, DEGUCHI J, HOSOYA T, HIRASAWA Y, HIROBE C, SHIRO M, MORITA H. Sucutiniranes C-F, Cassane-Type Diterpenes from *Bowdichia nitida*. **J Nat Prod.** 10: xx-xx, 2009.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain.** 54: 241-289. 1993

MERSKEY H. Conversion symptoms revised. **Semin Neurol.** 10: 221-228, 1990

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** 57: 1-164, 1999

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acessado em 2009

NOURSHARGH S, MARELLI-BERG FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends Immunol.** 26: 157-165, 2005

OBREJA, O.; RATHEE, P.K.; LIPS, K.S.; DISTLER, C.; KRESS, M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. **FASEB J** 16: 1497-1503, 2002.

OLIVEIRA, L. M. Farmacologia da Dor. In: Dor- Cavalcante, I. L.; Madalena, M. L. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, 37-52. 2003.

OKAJIMA K, HARADA N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. **Curr Med Chem.** 13: 2241-2251, 2006.

PETERSEN-ZEITZ KR, BASBAUM AI. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. **Pain.** 6: S5-12, 1999.

RATES SM. Plants as source of drugs. **Toxicon.** 39: 603-613, 2001

ROCHA L, MARSTON A, KAPLAN MA, STOECKLI-EVANS H, THULL U, TESTA B, HOSTETTMANN K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**. 36:1381-385, 1994

SALLÉ, J.L., 1996. O Totum em Fitoterapia - abordagem de fitoterapia, Robe Editorial, São Paulo, p.201.

SBED - Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. <http://www.dor.org.br> acesso maio de 2009.

SENIOR, K. Homing in on COX 3 - the elusive target of paracetamol. **Lancet Neurology**. 1: 399, 2002

SEHMI, R.; DORMAN, S.; BAATJES, A.; WATSON, R.; FOLEY, R.; YING, S.; ROBINSON, D.S.; KAY, A.B.; O'BYRNE, P.M.; DENBURG, J.A. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. **Immunology**. 109: 536-46, 2003.

SHERRINGTON CS. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. **J Physiol**. 34: 1-50, 1906.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response, Best. **Practi & Res Clin Anaesthesiol** 18(3): 385-405. 2004

SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. **J Ethnopharmacol**, 65: 21-27, 1999.

SHORE PA. A simple technique involving solvent extraction for the estimation of norepinephrine and epinephrine in tissues. **Pharmacol Rev**. 11: 276-277, 1959.

SILVA PM, ALVES AC, SERRA MF, PIRES AL, SILVA JP, BARRETO EO, CORDEIRO RS, JOSE PJ, TEIXEIRA MM, LAGENTE V, MARTINS MA. Modulation

of eotaxin formation and eosinophil migration by selective inhibitors of phosphodiesterase type 4 isoenzyme. **Br J Pharmacol** 134: 283-294, 2001.

SOUSA, O.V.; SOARES-JÚNIOR, D.T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R.G.; GATTASS, C.R.; KAPLAN, M.A.C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** 14: 11-14, 2004

SPRINGER TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell.** 76: 301-314, 1994.

SUDO, N.; TANAKA, K.; KOGA, Y.; OKUMURA, Y.; KUBO, C. and NOMOTO, K. Extracellular ATP activates mast cells via a mechanism that is different from the activation induced by the cross-linking of Fc receptors. **J Immunol.** 156: 3970-3979, 1996

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F. E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and modification by certain anti-inflammatory agents. **J Pharmacol Exp Ther** 10: 226-234. 1972

TESKE M, TRENTINI AM, 1997 *Compêndio de Fitoterapia Herbarium.*

TREEDE RD, KENSHALO DR, GRACELY RH, JONES AK. The cortical representation of pain. **Pain.** 79: 105-111, 1999

TREEDE, R.D. Peripheral acute pain mechanisms. **Ann Med.** 27: 213-216. 1995

VANE, J.R. and BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 38: 97-120. 1998

WENG HR, LEE JI, LENZ FA, SCHWARTZ A, VIERCK C, ROWLAND L, DOUGHERTY PM. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience.** 101: 393-401, 2000

WILLIAMS TJ. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **Br Med Bull.** 39: 239-242, 1983

WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**, 47: n.5, 1-9. 1994

WOOLF CJ, SALTER MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science.** 288: 1765-1769, 2000.

WUNN, T. A, CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol** 7: 505–511, 1995.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)