

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE DE DOUTORADO

**Avaliação do Potencial Anti-edematogênico, Antinociceptivo e
Anti-inflamatório do Extrato, Frações e Composto Flavonoide de
Cecropia hololeuca Miq. (Urticaceae)**

FELIPE MARQUES TEIXEIRA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-EDEMATOGÊNICO,
ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO,
FRAÇÕES E COMPOSTO FLAVONOIDE DE *Cecropia hololeuca* Miq.
(URTICACEAE)**

FELIPE MARQUES TEIXEIRA

Sob a orientação do Professor
Frederico Argollo Vanderlinde

e Coorientação do Professor
David do Carmo Malvar

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Fisiológicas, no Programa
Multicêntrico de Pós Graduação em
Ciências Fisiológicas, Área de
Concentração Fisiologia.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T 262 Teixeira, Felipe Marques, 1978-
Teia Avaliação do potencial anti-edematogênico,
 antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato, frações
 e composto flavonoide de Cecropia hololeuca miq.
 (Urticaceae) / Felipe Marques Teixeira. - 2018.
 115 f.: il.

 Orientador: Frederico Argollo Vanderlinde.
 Coorientador: David do Carmo Malvar.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas, 2018.

 1. Plantas medicinais. 2. Cecropia hololeuca. 3.
Flavonoide. 4. Rutina. 5. Artrite. I. Vanderlinde,
Frederico Argollo, 1950-, orient. II. Malvar, David
do Carmo, -, coorient. III Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Programa Multicêntrico de Pós
Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS


FELIPE MARQUES TEIXEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.


TESE APROVADA EM 27-10-2018



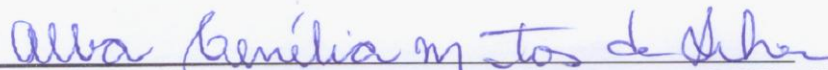
Prof Dr Frederico Argollo Vanderlinde (Orientador – UFRRJ)
(Presidente)



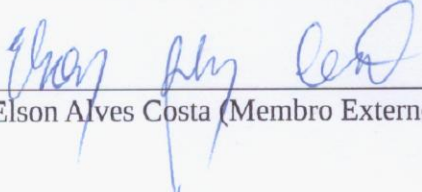
Prof Dr^a Maria Eline Matheus (Membro Externo – UFRJ)



Dr Fabio Fagundes da Rocha (Membro Interno – UFRRJ)



Prof Dr^a Alba Cenélia Matos da Silva (Membro Externo – DCFis - UFRRJ)



Prof Dr Elson Alves Costa (Membro Externo – UFG)

À Deus por guiar meus passos, dedico este trabalho.

À Raquel Saucier Gomes por continuar sempre ao meu lado.

Aos meus filhos Isabela, Mateus e Gabriel

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Frederico Argollo Vanderlinde pela orientação profissional e apoio pessoal, e ao Professor David do Carmo Malvar pela orientação, pela ajuda com hospedagem, treinamento e análise de amostras em Ribeirão Preto e por estar sempre disponível em contribuir para conclusão do projeto.

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, em especial aos professores Wellington da Silva Côrtez, Bruno Guimarães Marinho e Norma Aparecida dos Santos de Almeida, pela participação e conselhos em bancas de defesa de projeto e qualificação e por serem sempre solícitos em contribuir para execução do projeto de tese.

Às amigas Raquel Teixeira Ferreira e Geysa de Matos Dutra Mariano por dividir conceitos, metodologias e inúmeras horas de experimentos durante o doutorado.

À Prof^a Dr^a Sônia Soares Costa, à doutora Fernanda Chagas e às doutorandas Mariana Neubarth e Jaqueline de Souza, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN - UFRJ), pela colaboração inestimável e pelo trabalho impecável no estudo e fornecimento do material fitoquímico da *C. hololeuca*.

RESUMO

Teixeira, Felipe Marques. **Avaliação do potencial anti-edematogênico, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato, frações e composto flavonoide de *Cecropia hololeuca* Miq. (Urticaceae)**. 2018. 98 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

Cecropia hololeuca, popularmente conhecida como embaúba-prateada, pertence ao gênero *Cecropia* que consiste em cerca de 60 espécies, algumas delas amplamente utilizadas na medicina tradicional. Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal e responsáveis por uma variedade de atividades farmacológicas. Este estudo investigou o potencial anti-edematogênico, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso (EACH), frações aquosa (FAqCH), butanólica (FBuCH), enriquecida em flavonoides (FEFCH), flavonoídica (FFCH) e composto flavonoide da *Cecropia hololeuca*, bem como o possível mecanismo de ação. O pré-tratamento com EACH (30-1000 mg/kg, *p.o*) produziu inibição dose dependente das contorções induzidas pelo ácido acético (DI₅₀ 190 mg/kg) em camundongos machos albinos da linhagem *Swiss*. A administração oral de FAqCH (180 mg/kg) e FBuCH (120 mg/kg) reduziu as contorções induzidas por ácido acético em 80% e 37,9%, respectivamente. A administração oral de EACH (1 g/kg) não produziu efeito antinociceptivo enquanto o controle positivo fentanil (50 µg/kg, *s.c*) aumentou o limiar nociceptivo no teste de imersão da cauda. Adicionalmente, EACH não alterou a atividade motora no teste do rota-rod, ao contrário do diazepam (5 mg/kg, *i.p*). No teste de pleurisia induzida por carragenina, a avaliação do EACH (100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o*) evidenciou que a maior dose inibiu significativamente a migração de leucócitos em 50%, em relação ao veículo (1,5±0,3x10⁶ leucócitos/mL). Nos experimentos com FAqCH (60, 180 e 600 mg/kg, *p.o*) e FBuCH (400 mg/kg, *p.o*), observamos que FAqCH inibiu a migração de leucócitos de forma dose dependente em 35,7%, 67,7% e 85,4%, respectivamente, e FBuCH reduziu a migração de leucócitos em 68,8%, quando comparados ao veículo (2,9±0,4x10⁶ leucócitos/mL). Os animais pré-tratados com FEFCH (2,5, 5 e 10 mg/kg, *p.o*) reduziram a migração de leucócitos em 43,6%, 42,3% e 53,9%, respectivamente, em relação ao veículo (1,8±0,3 x10⁶ leucócitos/mL). No teste de pleurisia induzida por carragenina o controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c*) apresentou valores semelhantes para inibição da migração de leucócitos. No modelo de artrite induzida por zimosan EACH, FAqCH, FBuCH, FEFCH, FFCH e a rutina inibiram a formação do edema articular, a nocicepção e a migração de neutrófilos para o espaço articular em pelo menos uma das doses testadas. A administração da rutina (30 mg/kg, *p.o*) promoveu diminuição do diâmetro da articulação fêmur-tibial, antinocicepção através do teste de Von Frey e inibiu a migração de leucócitos para a cavidade articular em 42,9%, 24,4% e 48,7%, respectivamente, em relação ao veículo e semelhante ao controle positivo dexametasona. Adicionalmente, os tratamento com EACH (1 g/kg, *p.o*), rutina (30 mg/kg, *p.o*) e dexametasona (2 mg/kg, *s.c*) reduziram a concentração de TNF-α no macerado articular, em 32,8%, 47% e 64%, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (146,5±21,5 pg/g de tecido). Estes resultados indicam que o EACH e as frações isoladas da *Cecropia hololeuca* produziram atividade anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória. A avaliação da rutina no modelo de artrite induzida por zimosan sugere que este importante flavonoide possa ser responsável pelas atividades promovidas pelo EACH através da inibição de TNF-α, justificando os relatos do uso etnomedicinal desta espécie em doenças inflamatórias.

Key words: *Cecropia hololeuca*, flavonoides, rutina, artrite.

ABSTRACT

Teixeira, Felipe Marques. **Evaluation of the anti-edematogenic, antinociceptive and anti-inflammatory potential of the extract, fractions and flavonoid compound of *Cecropia hololeuca* Miq. (Urticaceae).** 2018. 98 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

Cecropia hololeuca, popularly known as embaúba-prateada, belongs to the genus *Cecropia* which consists of about 60 species, some of them widely used in traditional medicine. Flavonoids are widely distributed in the plant kingdom and responsible for the variety of pharmacological activities. This study investigated the anti-edematogenic, antinociceptive and anti-inflammatory potential of aqueous extract (EACH), aqueous (FAqCH), butanolic (FBuCH), enriched in flavonoids (FEFCH) and flavonoidic (FFCH) fractions and flavonoid compound of *Cecropia hololeuca*, as well as the possible mechanism of action. Were pretreated with EACH (30-1000 mg/kg, *p.o*) produces dose-related inhibition of acetic acid-induced writhing (ID_{50} 190 mg/kg) in Swiss albino mice, male (25-35g) (CEUA/UFRRJ -n° 012/2014). Oral administration of FAqCH (180 mg/kg) e FBuCH (120 mg/kg), reduced the acetic acid-induced writhing at 80% e 37,9%, respectively. Oral administration of EACH (1 g/kg) did not produces antinociceptive effect while the positive control fentanyl (50 μ g/kg, *s.c.*) increased the nociceptive threshold in the tail immersion test. Additionally, EACH did not change the motor activity in the rota-rod test, unlike diazepam (5 mg/kg, *i.p*). In the carrageenan-induced pleurisy test, the evaluation of the EACH (100-1000 mg/kg, *p.o.*) showed that the dose of 1000 mg/kg significantly inhibited leukocyte migration at 50%, relative to vehicle ($1,5 \pm 0,3 \times 10^6$ leukocytes/mL). In the experiments with FAqCH (60, 180 and 600 mg/kg, *p.o*) and FBuCH (400 mg/kg, *p.o*), we observed that FaqCH presented dose-related inhibition of the migration of leukocytes at 35.7%, 67.7% and 85.4%, respectively, and FBuCH reduced leukocyte migration at 68.8%, when compared to vehicle ($2,9 \pm 0,4 \times 10^6$ leukocytes/mL). The animals pretreated with FEFCH (2.5; 5 and 10 mg/kg, *p.o*), reduced leukocyte migration at 43.6%, 42.3% and 53.9%, respectively, relative to vehicle ($1,8 \pm 0,3 \times 10^6$ leukocytes/mL). In the carrageenan-induced pleurisy test, the positive control dexamethasone (2 mg/kg, *s.c*) presented similar values for inhibition of leukocyte migration. In the zymosan-induced arthritis model EACH, FAqCH, FBuCH, FEFCH, FFCH and rutin inhibited the formation of joint edema, nociception and migration of neutrophils into joint space in at least one of the doses tested. Administration of rutin (30 mg/kg, *p.o*) promoted a decrease in femur-tibial joint diameter, antinociception by the Von Frey test and inhibited the migration of leukocytes to the joint cavity, in 42.9%, 24.4% and 48.7%, respectively, relative to the vehicle and similar to the positive control dexamethasone. Additionally, the treatment with EACH (1 g/kg, *p.o*), rutin (30 mg/kg, *p.o*) and dexamethasone (2 mg/kg, *s.c*) reduced the concentration of TNF- α in the joint macerate, at 32,8%, 47% and 64%, respectively, when compared to the vehicle group ($146,5 \pm 21,5$ pg/g tissue). These results indicate that EACH and the isolated fractions of *Cecropia hololeuca* produced anti-edematogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activity. The evaluation of the rutin in the zymosan-induced arthritis model suggests that this important flavonoid may be responsible by the activities promoted by EACH through of the inhibition of TNF- α , justifying the reports of the ethnomedicinal use of this species in inflammatory diseases.

Key words: *Cecropia hololeuca*, flavonoids, rutin, arthrtis.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Ciclo dos metabólitos secundários.
- Figura 2:** Estrutura básica geral dos flavonoides.
- Figura 3:** Estrutura química de rutina.
- Figura 4:** Componentes da via inflamatória.
- Figura 5:** Cascata de recrutamento de neutrófilos onde se destaca a sequencia de recrutamento dos neutrófilos da vasculatura para os tecidos, os dois mecanismos possíveis de transmigração de neutrófilos (paracelular e transcelular) e os principais grupos de moléculas de adesão.
- Figura 6:** Metabolização do ácido araquidônico e formação de mediadores eicosanoides.
- Figura 7:** Ilustração simplificada do mecanismo de sinalização de receptores para TNF- α (TNFR1 e TNFR2).
- Figura 8:** Mediadores periféricos da inflamação e seus respectivos receptores na superfície celular do nociceptor. Os mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, CGRP, bradicinina, eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinoides, NGF, TNF- α , IL-1, proteases extracelulares e prótons) e os receptores se superfície celular GPCR (receptor acoplado a proteína G), canais potencial receptor transiente (TRPc), canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), canais de potássio de dois poros (K2P) e receptores de tirosina quinase (RTK).
- Figura 9:** Influência do ambiente articular e dos fatores predisponentes para osteoartrite na integração do processamento sensorial periférico e central da dor.
- Figura 10:** Ilustração dos mecanismos de dor induzida pela osteoartrite nos níveis periférico e central (espinhal e supraespinhal).
- Figura 11:** Amostras de inflorescências e folhas de uma espécime masculina de *Cecropia hololeuca*.
- Figura 12:** Cromatogramas (280 nm) de FEFCH (A), FFCH (B) e SCH (C) (CLAE-DAD).
- Figura 13:** Fluxograma da extração e fracionamento das folhas de *Cecropia hololeuca*.
- Figura 14:** Fluxograma do fracionamento das folhas de *Cecropia hololeuca* destacando a quantidade de massa extraída, bem como seus respectivos rendimentos. Extrato Aquoso (EACH), fração butanólica (FBuCH), fração aquosa (FAqCH), fração enriquecida em flavonoides (FEFCH), fração flavonoidica (FFCH), composto livre de flavonoides (SCH).

- Figura 15:** Efeito do pré-tratamento por via oral com o EACH (30, 100, 300 e 1000 mg/kg) ou com indometacina (10 mg/kg) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam as médias \pm erro padrão da média do número de contorções acumuladas em 30 minutos de 6 a 8 camundongos, por grupo experimental.
- Figura 16:** Porcentagem de inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/kg, *i.p.*) em camundongos previamente tratados (60 minutos) pela via oral com EACH (30, 100 e 300 mg/kg). Os símbolos e linhas verticais representam as médias \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo experimental.
- Figura 17:** Efeito do pré-tratamento por via oral com o FAqCH (180 mg/kg), FBUCH (120 mg/kg) ou com indometacina (10 mg/kg) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam as médias \pm erro padrão da média do número de contorções acumuladas em 30 minutos de 6 a 8 camundongos, por grupo experimental.
- Figura 18:** Efeito do EACH (1g/Kg, *p.o.*) e do Fentanil (50 μ g/kg, *s.c.*) sobre a latência em segundos induzida pela imersão da cauda em água quente (55°C \pm 1°C) no teste de imersão da cauda. Os símbolos (● VEÍCULO, ▲ FENTANIL e ■ EACH) e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média das variações da latência em segundos 8 camundongos por grupo experimental (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).
- Figura 19:** Efeito do extrato aquoso de *Cecropia hololeuca* (EACH: 1g/Kg, *p.o.*) e do diazepam (5 mg/kg, *i.p.*) no tempo de permanência dos camundongos na barra giratória (12 rpm/máximo de três quedas), no teste do rota-rod. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média \pm erro padrão da média (n=8).
- Figura 20:** Efeito do EACH (100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. * $p < 0,05$, significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 8 camundongos.
- Figura 21:** Efeito da FAqCH (60, 180 e 600 mg/kg, *p.o.*), da FBUCH (400mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média \pm E.P.M. de 8 camundongos.
- Figura 22:** Influência do pré-tratamento com a FEFCH (2,5, 5 e 10 mg/kg, *p.o.*) e dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para cavidade pleural (médias \pm erro padrão da média) induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para n = 8 animais.

- Figura 23:** Efeito do EACH (1g/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de n=10 (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).
- Figura 24:** Efeito da FAqCH (180 e 600 mg/kg, *p.o.*), da FBUCH (400 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de n=10 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).
- Figura 25:** Efeito da FEFCH (2,5, 10, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de n=10 (*** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo).
- Figura 26:** Efeito da SCH (55mg/kg, *p.o.*) e da FFCH (45 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão de média de n=10 (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).
- Figura 27:** Efeito da Rutina (30 mg/kg, *p.o.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária ($\times 10^4$ /ml), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de n=10 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).
- Figura 28:** Efeito do EACH (1000 mg/kg, *p.o.*) e da rutina (30 mg/kg, *p.o.*) sobre a variação da espessura (mm) e a concentração de TNF- α (pg/g) articular induzida por zimosan em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de n=8-9. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo.

- Tabela 1:** Flavonoides descritos para *Cecropia sp.*
- Tabela 2:** Estrutura de duas das principais classes de flavonoides (flavonas e flavonóis).
- Tabela 3:** Estruturas dos principais flavonoides identificados na análise fitoquímica das folhas de *Cecropia hololeuca* por Cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE-DAD).
- Tabela 4:** Dados da CLAE-DAD-ESI-MS/MS dos compostos 1-6 presentes em FFCH.
- Tabela 5:** Tratamentos e respectivas doses para o estudo dos compostos extraídos da *Cecropia hololeuca*, considerando seus respectivos rendimentos, no modelo de artrite induzida por zimosan.
- Tabela 6:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de contorções abdominais apresentados pelo EACH e INDO no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/Kg, *i.p.*). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para $n = 6$ a 8 animais.
- Tabela 7:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de contorções abdominais apresentados pela FAqCH, FBuCH e pela INDO no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/Kg, *i.p.*). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para $n = 6$ a 8.
- Tabela 8:** Médias \pm EPM da latência em segundos apresentados pelo EACH e pelo fentanil no modelo de imersão da cauda em água quente ($55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para $n = 8$ animais.
- Tabela 9:** Médias \pm EPM do tempo de permanência na barra giratória (12 rpm) apresentados pelo EACH e pelo diazepam no teste do rota-rod. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo.
- Tabela 10:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pelo EACH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. * $p < 0,05$, para $n = 8$ animais.
- Tabela 11:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pela FAqCH, FBuCH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 8$ animais.
- Tabela 12:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pela FEFCH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 8$ animais.
- Tabela 13:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos ($10^4/\text{mL}$) apresentados pelo EACH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.

- Tabela 14:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentados pela FAqCH, FBuCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.
- Tabela 15:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentados pela FEFCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.
- Tabela 16:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentadas pela SCH, FFCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.
- Tabela 17:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentados pela rotina e DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.
- Tabela 18:** Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm) e da concentração de TNF- α (pg/g) apresentados pelo EACH, rotina e DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina e * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo, para $n = 8$ a 9 animais.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ADAMTS - Desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C5A – Complemento 5A
CAM – Moléculas de adesão celular
CB1/CB2- Receptores canabinoides 1 e 2.
Ciplan – Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação
CLAE - Cromatografia líquida e alta eficiência
CLAE/DAD - Cromatografia líquida e alta eficiência em detector de arranjo de diodos
CO₂ – Dióxido de carbono
COX-1 – Cicloxigenase -1
COX-2 Cicloxigenase-2
DEXA – Dexametasona
EACH – Extrato aquoso bruto de *Cecropia hololeuca*
ECA- Enzima conversora de angiotensina
ERN – Espécie reativa de nitrogênio
EROS – Espécie reativa de oxigênio.
FADD - proteína associada ao receptor Faz com domínio da morte
FAP – Fator de agregação plaquetária
FAqCH – Fração aquosa de *Cecropia hololeuca*
FBuCH – Fração butanólica de *Cecropia hololeuca*
FEFCH – Fração enriquecida em flavonoides de *Cecropia hololeuca*
FFCH – Fração flavonoídica de *Cecropia hololeuca*
FLA₂ – Fosfolipase A₂
FTC-β – Fator transformado de crescimento-β
HETE - hidroeicosatetraenoico
HPETE – hidroperoxieicosatetraenoico
ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular-1
ICAM-2 – Molécula de adesão intracelular-2
IL-1 – Interleucina-1
IL-10 – Interleucina-10
IL-13 – Interleucina-13
IL-1AR – Antagonista do receptor de interleucina-1
IL-1RI – Receptor I para interleucina-1
IL-1RII – Receptor II para interleucina-1
IL-1α – Interleucina-1α
IL-1β – Interleucina-1β
IL-2 – Interleucina-2
IL-2 – Interleucina-2
IL-35 – Interleucina-35
IL-4 – Interleucina-4
IL-6 – Interleucina-6
IL-7 – Interleucina-7

IL-8 – Interleucina-8
INDO - Indometacina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
I κ B α - proteína inibidora de NF- κ B
JAM – Molécula de adesão juncional
LOX-12 – 12-Lipoxigenase
LOX-15 – 15-Lipoxigenase
LOX-5 – 5-Lipoxigenase
LTA₄ – Leucotrieno A4
LTA₄H – Leucotrieno A4 hidrolase
LTB₄ – Leucotrieno B4
LTC₄ – Leucotrieno C4
LTD₄ – Leucotrieno D4
LTE₄ – Leucotrieno E4
MMP – Metaloproteínases
NF- κ B – fator nuclear- κ B
NLRP3 - Nucleotide-binding domain-like receptor
NO₂ – Dióxido de nitrogênio
O₂ - Oxigênio
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PCAM-1- Molécula de adesão endotelial plaquetária-1
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF_{2 α} – Prostaglandina F_{2 α}
PGG₂ – Prostaglandina G₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂ ou Prostaciclina
PMN – Polimorfonucleares
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RIP – Proteína interativa do receptor
SCH – Fração livre de flavonoides
SO₂ – Dióxido de enxofre
TACE – Enzima conversora de TNF
TLRS – Receptores Toll Like
TNFR1- Receptor de TNF-1
TNFR2- Receptor de TNF-2
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
TRADD - a proteína de domínio morte associada ao TNFR1
TRAF2 - proteína fator-2 associado ao TNF- α
TVPV-1 - Receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1
VCAM-1 – Molécula de adesão vascular-1
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1	Plantas medicinais	1
1.1.1	Considerações gerais	1
1.1.2	Pesquisa com plantas medicinais	1
1.1.3	Metabólitos vegetais e os compostos fenólicos	2
2	O GÊNERO <i>Cecropia</i> LOEFLING, 1758	4
2.1	Perfil químico do gênero <i>Cecropia</i>	4
2.2	Espécies do gênero <i>Cecropia</i>	5
2.2.1	<i>Cecropia hololeuca</i> Miquel	6
2.2.2	Outras espécies do gênero <i>Cecropia</i> sp	6
3	FLAVONOIDES	8
3.1	Estrutura e classificação dos flavonoides	8
3.2	Potencial terapêutico dos flavonoides	11
3.3	A Rutina	12
4	INFLAMAÇÃO	16
4.1	Considerações gerais	16
4.2	Migração de leucócitos	17
4.3	Mediadores eicosanoides	19
4.4	Citocinas	23
4.4.1	Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)	23
4.4.2	Interleucina-1 (IL-1)	26
4.4.3	Interleucina-6 (IL-6)	26
4.4.4	Quimiocinas	27
4.5	Nocicepção	28
4.5.1	O processamento nociceptivo	28
4.5.2	Sensibilização periférica	30
5	OSTEOARTRITE	33
5.1	Patogênese da osteoartrite	33
5.2	Dor na osteoartrite	34
5.3	Modelos animais para estudo da osteoartrite	36
5.3.1	Artrite induzida por zimosan	37
6	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	39
7	MATERIAIS E MÉTODOS	40
7.1	Material botânico	40
7.2	Prospecção fitoquímica	40
7.3	Animais	43
7.4	Fármacos, solventes e reagentes	44
7.5	Métodos Farmacológicos	44
7.5.1	Determinação das doses conforme os rendimentos	44
7.5.2	Avaliação da atividade antinociceptiva	45

7.5.2.1	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	45
7.5.2.2	Teste de imersão da cauda	46
7.5.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	46
7.5.3.1	Teste da pleurisia induzida pela carragenina	46
7.5.3.2	Modelo de artrite induzida por zimosan	46
7.5.4	Avaliação da atividade motora - Teste do Rota-rod	47
7.6	Avaliação do mecanismo de ação	48
7.6.1	Determinação da concentração articular de TNF- α	48
7.7	Análise estatística	48
8	RESULTADOS	49
8.1	Teste de atividade antinociceptiva	49
8.1.1	Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	49
8.1.2	Teste de imersão da cauda	52
8.2	Avaliação da atividade motora - Teste do Rota-rod	53
8.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	54
8.3.1	Teste da pleurisia induzida por carragenina	54
8.3.2	Modelo da artrite induzida pelo zimosan	57
8.4	Avaliação do mecanismo de ação	67
8.4.1	Determinação da concentração articular de TNF- α	67
9	DISCUSSÃO	69
10	CONCLUSÃO	78
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Plantas medicinais

1.1.1 Considerações gerais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais e, a busca por alívio e cura de doenças, por meio da ingestão de ervas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, moradia, proteção e reprodução. Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS JR. et al., 2006). Segundo Rocha e colaboradores (2015), o uso de plantas medicinais pelo homem acompanha a sua história. Registros arqueológicos apontam a sua importância cultural desde 60.000 anos a.C. Povos antigos como os Egípcios, Gregos, Hindus, Persas e mais recentemente os povos da América Pré-colombiana, aplicavam extensamente tais recursos terapêuticos, contribuindo para a construção dos sistemas de medicina tradicional dispersos ao redor do mundo.

No Brasil, o consumo de plantas medicinais antecede a chegada dos portugueses em 1.500. Gradualmente, os colonizadores assimilaram os recursos da medicina indígena, incorporando-os em sua própria farmacopeia. Ao longo dos séculos XVI, XVII e XVIII, em decorrência do intenso tráfego de informações e de matéria-prima entre o Brasil e a Europa, produtos derivados da biodiversidade vegetal brasileira foram amplamente empregados na Europa, alimentando uma lucrativa rede comercial e fazendo com que o conhecimento tradicional brasileiro tivesse marcante influência sobre o que hoje é conhecido como “Medicina Ocidental” (ROCHA et al, 2015). O conhecimento sobre o uso das plantas medicinais compilado em terras brasileiras, ao chegar à Europa era ressignificado e apropriado para cultura europeia e, posteriormente, retornava ao Brasil na forma de livros e farmacopeias oficiais (SÁ & ELIZABETSKY, 2012).

Até meados do século XX, o uso de plantas medicinais no Brasil para o tratamento dos problemas de saúde da população era baseado na experiência e transmitido de forma oral. Contudo, com o crescente desenvolvimento da fitoquímica, novas substâncias foram isoladas em laboratório e delas novos produtos sintéticos surgiram, levando a substituição do uso das plantas por medicamentos sintetizados em laboratório, consolidando a indústria farmacêutica (BRUNING et al., 2012).

No século XXI vive-se um paradoxo da abundância na área de saúde. O conhecimento da ciência e da tecnologia é enorme e cada vez mais veloz oferecendo infinitas possibilidades tecnológicas de tratar praticamente todas as formas de doenças. Entretanto, nem sempre essas possibilidades têm sido aproveitadas para melhorar o acesso das populações aos medicamentos, que continuam com seus preços exorbitantes e incompatíveis com os orçamentos de saúde dos países, incluindo países desenvolvidos e em desenvolvimento. Neste contexto em que é necessário assegurar o acesso a medicamentos seguros, eficazes, de qualidade e a preços acessíveis à população, a indústria de plantas medicinais e de fitoterápicos pode representar uma excelente alternativa constituindo importante fonte de inovação em saúde e fortalecendo a produção e a inovação local com base na exploração da rica biodiversidade brasileira (HASENCLEVER e al., 2017).

1.1.2 Pesquisa com plantas medicinais

A RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 definiu planta medicinal como toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos, enquanto fitoterápico é o

produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014). A importância das plantas medicinais para a química e a medicina moderna permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos e assim, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

De maneira geral, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores e estudos envolvendo áreas multidisciplinares (MACIEL et al., 2002), fomentando o trabalho de várias instituições pesquisa que desenvolvem trabalhos, que possibilitam o maior esclarecimento de práticas tradicionais com espécies medicinais, colaborando para o acesso seguro às plantas medicinais e fitoterápicas (GONÇALVES et al., 2011). Neste contexto, a atuação multidisciplinar é fundamental para prática nesse setor, pois há entre os grupos de estudos diferentes atribuições tais como, a investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica e fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos (MACIEL et al., 2002).

Dois disciplinas científicas têm se destacado nesta tarefa: a etnobotânica e a etnofarmacologia. Por definição, a etnobotânica se ocupa da inter-relação direta entre pessoas e plantas, incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais e a etnofarmacologia se ocupa do estudo dos preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde e doença (empregadas na medicina popular) que incluem isoladamente ou em conjunto plantas, animais, fungos ou minerais (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). Além disso, é crucial para o sucesso na obtenção de princípios ativos, que seja feita uma diferenciação entre a pesquisa etnofarmacológica onde o planejamento de um modelo experimental para comprovar uma propriedade terapêutica deve considerar o contexto no qual elas são tidas como medicinais e o modelo clássico de Farmacologia dos Produtos Naturais que aborda inespecificamente as características químicas e farmacológicas das substâncias naturais (SIXEL et al., 2005).

1.1.3 Metabólitos vegetais e os compostos fenólicos

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (PEREIRA & CARDOSO, 2012). As plantas, através do metabolismo primário e secundário, produzem ampla diversidade de componentes orgânicos. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os metabólitos secundários, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Os compostos orgânicos que constituem os metabólitos secundários são produzidos por estímulos externos (WINK, 2015), possui estrutura complexa, baixo peso molecular, apresentam-se em baixas concentrações e possuem atividades biológicas marcantes, tais como: defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raio ultravioleta, atração de polinizadores, dentre outras atividades (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Em geral, os metabólitos secundários exibem uma ampla gama de fatores biológicos e propriedades farmacológicas, interagindo com os principais alvos nas células, tais como proteínas, biomembranas ou ácidos nucleicos. Por isso, algumas plantas ou produtos isolados delas são usados para tratar diversos tipos de doenças (WINK, 2015). Desta forma, estas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio e despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2007).

Segundo Simões e colaboradores (2007), os metabólitos secundários originam-se a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato, dois importantes intermediários do metabolismo da glicose. O ácido chiquímico é precursor de compostos que possuem anel aromático na sua constituição como os taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanoides. Os metabólitos secundários originados da via do acetato são os aminoácidos alifáticos e seus derivados, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e triglicerídeos (LEITE, 2008). Alguns metabólitos como as antraquinonas, os flavonoides e os taninos condensados originam-se da combinação dos dois percussores, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 1) (SIMÕES et al., 2007).

Dentre os metabólitos secundários, os compostos fenólicos representam um grupo diverso de moléculas, amplamente distribuídos no reino vegetal, que possuem uma grande variedade estrutural e funcional. Eles podem ser classificados em compostos solúveis em água como os ácidos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas e compostos insolúveis em água, entre eles os taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos (HAMINIUK et al., 2012). Quimicamente, sua estrutura básica, é caracterizada por possuir pelo menos um anel aromático, no qual um ou mais hidrogênios são substituídos por um grupamento hidroxila, podendo variar de uma simples molécula fenólica a um polímero complexo de massa molecular elevada (KHODDAMI et al., 2013). Os flavonoides, presentes no grupo dos compostos fenólicos, constituem uma importante classe de metabólito secundário, com relativa abundância nos vegetais e diversas atividades biológicas e farmacológicas reconhecidas, tais como, atividade anti-inflamatória, anti-oxidante, antitumoral, antiviral, anti-ulcerogênica e anti-hemorrágica (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

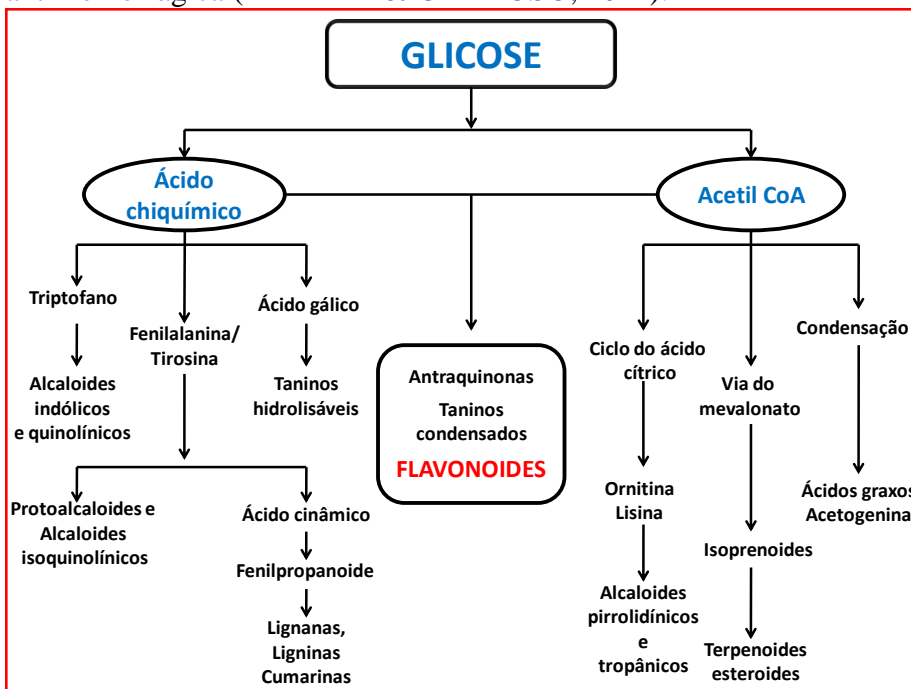


Figura 1: Ciclo dos metabólitos secundários (modificado de SIMÕES et al., 2007).

2. O GÊNERO *Cecropia* LOEFLING, 1758

O nome científico deste gênero, criado pelo botânico Loeffling em 1758, vem do grego “Cecrops”, uma criatura mitológica metade serpente e metade homem ou ainda um personagem de origem egípcia que teria sido o primeiro rei da Ática e ensinado a agricultura (BERG & ROSSELLI, 2005). De acordo com os conceitos adotados na classificação botânica, An Integrated System of Classification of Flowering Plants (CRONQUIST, 1981), o gênero *Cecropia* está inserido na família Cecropiaceae e esta, por sua vez, na ordem Urticales. Enquanto segundo os critérios mais modernos utilizados pelo Angiosperm Phylogeny Group Classification (APG III, 2009), este gênero pertence à família Urticaceae da ordem Rosales.

O gênero *Cecropia* compreende cerca de 60 espécies de árvores distribuídas em toda a América Latina, algumas ocorrendo no Brasil. No Brasil, as espécies deste gênero são mais conhecidas pelos nomes populares embaúba, imbaúba ou umbauá e outras variações. Eles provêm do termo “ambaíba”, que no tupi significa árvore oca, uma alusão aos caules ocos das espécies de *Cecropia*. Esses nomes populares podem depender também das cores de suas flores como é o caso da embaúba-vermelha (*Cecropia glaziovii*) e embaúba branca (*Cecropia palmata*) (COSTA et al., 2011-A). São encontradas em vegetação secundária na forma de árvores com altura entre cinco e 25 metros. Seu tronco é segmentado, ereto e oco, possuem folhas largas com a cor e a textura de característica da espécie e as inflorescências são carnudas variando na cor de cinza para vermelho (BERG & ROSSELLI, 2005).

No estado do Rio de Janeiro ocorrem cinco espécies de *Cecropia*, *C. catharinensis*, *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. lyratiloba* e *C. pachystachya*. Entretanto, *C. pachystachya* não pertence à flora fluminense, tendo sido cultivada a partir de sementes colhidas em Minas Gerais (BERG & ROSSELLI, 2005).

Vários relatos etnofarmacológicos foram feitos na literatura relacionando o uso popular destas espécies, principalmente na forma de chá, para controlar a diabetes, a pressão arterial e no tratamento de doenças respiratórias (COSTA et al., 2011-A).

2.1 Perfil químico do gênero *Cecropia*

Das mais de 60 espécies deste gênero, apenas 10 apresentam relatos sobre seus compostos químicos. Os estudos sobre o perfil de metabólitos secundários de embaúbas relatam a presença de substâncias fenólicas da classe dos ácidos fenólicos, flavonoides, flavolignanas e taninos condensados (procianidinas), além de terpenoides com esqueleto de triterpeno (COSTA et al., 2011-B).

Os ácidos fenólicos são compostos que apresentam um grupo funcional carboxila e são divididos em ácidos hidroxibenzoicos (taninos hidrolizáveis) e ácidos hidroxicinâmicos (D'ARCHIVIO et al., 2007). Entre seus compostos principais se destacam o ácido caféico, *p*-cumárico e ferúlico que são encontrados em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas e cereais (LAFAY et al., 2008).

Os triterpenos são compostos de 30 carbonos originados das unidades de isopreno de cinco carbonos, constituindo estruturalmente diversas classes de produtos naturais e amplamente distribuídos dentro do reino vegetal (GHOSH, 2017). Embora sejam frequentemente objeto de investigações fitoquímicas e farmacológicas, seu potencial terapêutico é pouco conhecido. Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram a suas propriedades antitumorais, anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-esclerótica e antiviral (NAZARUK & BORZYM-KLUCZYK, 2015).

As proantocianidinas oligoméricas e poliméricas (taninos condensados) constituem um dos grupos mais amplamente distribuídos de todas as substâncias fenólicas em plantas (CHAGAS, 2013). Nos últimos anos, o interesse por estes compostos aumentaram, uma vez

que pesquisas têm demonstrado que são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (KÄHKÖNEN & HEINONEN, 2003).

Flavonoides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenoides e ácidos graxos. Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos. Estão presentes na maioria das plantas concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (DORNAS et al., 2007). Os flavonoides já identificados em embaúbas pertencem às classes dos flavan-3-óis (catequinas), flavonóis e flavonas (Tabela 1). As flavonas C-glicosiladas com aglicona do tipo apigenina ou luteolina são os flavonoides mais comuns no gênero. Diferentemente das flavonas O-glicosídicas, as substâncias que apresentam o açúcar diretamente ligado ao núcleo básico flavonoídico (C-glicosiladas) sofrem a glicosilação numa etapa anterior a final, provavelmente após a oxidação das flavanonas (CHAGAS, 2013).

Tabela 1: Flavonoides descritos para *Cecropia sp.* (Modificado de MÜLLER, 2016-B).

<i>Cecropia sp</i>	Partes da planta	Flavonoides	Referências
<i>C. glaziovii</i>	Estípulas e folhas	Isoquercetrina Orientina Isoorientina Isovitexina	LACAILLE-DUBOIS et al., 2001 COSTA et al., 2011-B
<i>C.pachystachya</i>	Folhas	Isoquercetrina Isoorientina Isovitexina	LACAILLE-DUBOIS et al., 2001 ARAGÃO et al., 2010 COSTA et al., 2011-B ARAGÃO et al., 2013
<i>C. hololeuca</i>	Folhas e cascas	Orientina Isoorientina	LACAILLE-DUBOIS et al., 2001
<i>C. lyratiloba</i>	Folhas	Orientina Isoorientina Isovitexina C-glicosilflavona	ROCHA et al., 2007
<i>C.obtusifolia</i>	Folhas	Isoorientina	ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001

2.2 Espécies do gênero *Cecropia*

Cecropia é um gênero reconhecidamente medicinal, enquanto algumas espécies vêm sendo exaustivamente pesquisadas, na maioria das vezes, considerando o uso popular que apresentam, tais como *Cecropia glaziovii*, *Cecropia obtusifolia* e *Cecropia pachystachya*, entretanto outras espécies do gênero, como *Cecropia hololeuca*, ainda carecem de informações sobre suas atividades biológicas, bem como sobre as substâncias responsáveis por estas atividades (CHAGAS, 2013).

2.2.1 *Cecropia hololeuca* Miquel

Cecropia hololeuca é uma espécie vegetal dióica e pioneira que ocorre no bioma Mata Atlântica, é uma espécie que apresenta ampla distribuição no território brasileiro, sendo encontrada desde a região Nordeste até o Sul, servindo de alimento para vários animais (CHAGAS, 2013).

A expressão “hololeuca” origina-se do grego “holos” e “leuco” que significa “todo” e “branco”, respectivamente. É uma referência aos pelos esbranquiçados que conferem aspecto prateado às folhas, característica que inspirou o nome popular dado a esta espécie, embaúba-prateada (BERG & ROSSELLI, 2005).

A análise fitoquímica desta planta, principalmente sua folhas, revelou a presença de açúcares redutores, saponina espumídica, proteínas e aminoácidos, taninos catéquicos, derivados de cumarina, esteroides e triterpenoides (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001).

Há registros do uso medicinal de *Cecropia hololeuca* desde o século 19, sendo, inclusive, a única espécie do gênero a constar na 1ª edição da Farmacopeia Brasileira de 1926 (BRANDÃO et al., 2009). Conforme relatos etnobotânicos, suas folhas principalmente, apresentam efeitos diurético, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antitussígeno, expectorante, antitérmico e antitumoral (BOTSARIS, 2007).

2.2.2 Outras espécies do gênero *Cecropia* sp

Cecropia glaziovii Sneth e *Cecropia pachystachya* Trécul são as duas espécies mais comuns no Sudeste e Sul do Brasil e, embora possuam características morfológicas distintas, como sua altura e cor das folhas, ambas são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira (COSTA et al., 2011-A).

Cecropia glaziovii tem seus extratos brutos utilizados na fitoterapia brasileira como cardiotônicos, diuréticos e para o alívio da tosse na bronquite e asma. (LIMA-LANDMAN et al., 2007). Estudos pré-clínicos confirmaram sua ação anti-hipertensiva, broncodilatadora, hepatoprotetora, ansiolítica e antidepressiva (MÜLLER et al., 2016-A). Investigações experimentais demonstraram seu extrato aquoso promoveu efeito hipotensor não relacionado à inibição da enzima conversora de angiotensina (NINAHUAMAN et al., 2007), apresentou efeito anti-ulcerogênico ao diminuir a secreção da mucosa gástrica por inibição da bomba $H^+K^+ATPase$ (SOCCAR et al., 2008) e demonstrou atividade hepatoprotetora em ensaio de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (PETRONILHO et al., 2012).

Conforme descrito por Costa e colaboradores (2011-B), em relação à constituição química desta espécie, a análise do extrato enriquecido em compostos fenólicos por cromatografia líquida e alta eficiência em detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) permitiu a identificação de cinco substâncias fenólicas (isoorientina, orientina, isovitexina, isoquercetrina e o ácido clorogênico), sendo que apenas três deles foram isoladas a orientina, isoorientina e isovitexina.

Cecropia pachystachya é uma planta típica de margens de floresta, e suas folhas e cascas são descritas na medicina popular como possuindo efeitos antitussígenos, expectorantes, anti-asmáticos e hipoglicêmicos (GAZAL et al., 2014). Consolini e Migliori (2005) relataram que além do uso medicinal da *C. pachystachya* para transtornos respiratórios, como tosse e asma, são aceitas popularmente como cardiotônico e diurético. Investigações etnobotânicas, realizadas no Brasil, tem mostrado seu uso no tratamento de inflamações na vesícula urinária e doenças renais (ALVES & POVH, 2013) e como analgésico para controle da dor renal (BESSA et al., 2013). Experimentalmente, seu extrato aquoso, demonstrou efeito neuroprotetor e antidepressivo em modelo de estresse crônico em camundongos (GAZAL et al., 2014) e atenuou a hipertensão renal em ratos nefrectomizados (MAQUIAVELI et al., 2014).

No método analítico desenvolvido e validado por Costa e colaboradores (2011-B), para caracterização química e quantificação simultânea dos compostos majoritários de extrato aquosos das folhas de *Cecropia* sp., foram encontrados para espécie *C. pachystachya*: ácido clorogênico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina.

Cecropia obtusifolia Bertol., é uma árvore que cresce em vegetação secundária na floresta tropical ao longo das duas costas do México, sendo o infuso de suas folhas comumente usados na medicina popular mexicana para tratar o diabetes do tipo 2 (TOLEDO et al., 2008). Segundo Revilla-Monsalve e colaboradores (2007), a *Cecropia obtusifolia* tem demonstrado propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, hipotensoras, relaxante muscular e depressora do sistema nervoso central, porém o efeito hipoglicemiante destaca-se como a atividade mais importante. Existem poucos estudos sobre a composição a composição fitoquímica de *C. obtusifolia*. Alguns relatos indicam que suas folhas e a cascas contêm alcaloides, glicosídeos, flavonoides, taninos, triterpenoides e saponinas (PÉREZ-GUERRERO et al, 2001).

3. FLAVONOIDES

O termo flavonoides deriva da palavra latina “flavus” que significa “amarelo” (SALARITABAR et al., 2017). São substâncias pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos que constituem uma categoria de compostos fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário com diversas atividades biológicas na fisiologia e bioquímica das plantas (KACHLICKI et al., 2016) e com papel fundamental na sua proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010). Embora não possam ser sintetizados por humanos e animais (KOES et al., 2005), desempenham um papel fundamental na dieta através da ingestão de alimentos ricos nestes compostos (SALARITABAR et al., 2017).

Os flavonoides representam o grupo de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo encontrados em praticamente todas as partes dos vegetais e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (WANG et al., 2018). Diversos estudos descrevem as propriedades biológicas dos flavonoides, entre elas as atividades antitumoral, anti-oxidante, antiviral e anti-inflamatória, conferindo inúmeros benefícios à saúde humana pela diminuição do risco de doenças. Desta forma, os flavonoides apresentam significativa importância farmacológica estimulando investigações sobre potenciais terapêuticos destes compostos (KUMAR & PANDEY, 2013).

3.1 Estrutura e classificação dos flavonoides

Quimicamente, os flavonoides são uma classe de moléculas de baixo peso molecular, com estrutura base de 15 carbonos (C₆-C₃-C₆), constituída por dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano ou pirona (C) (Figura 2). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em classes que incluem as flavonas, flavonóis, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas. Dentro de cada uma das classes, os compostos diferem entre si devido ao padrão de substituição dos anéis A e B (KUMAR & PANDEY, 2013).

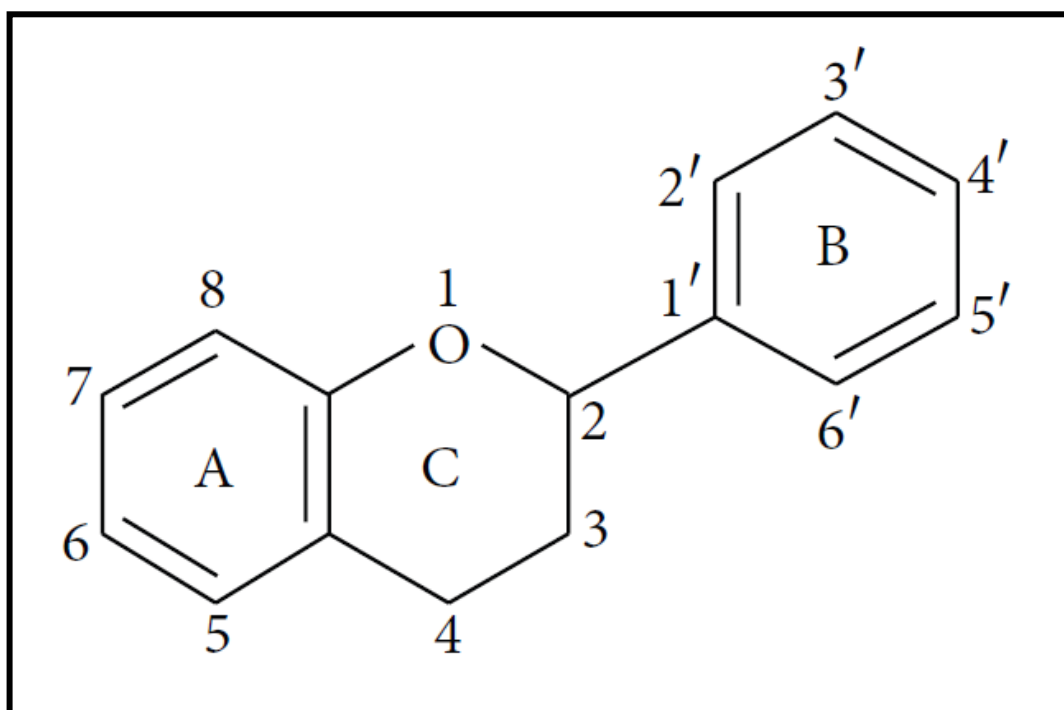


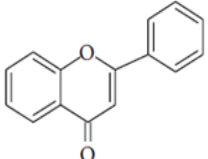
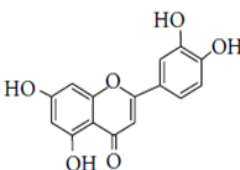
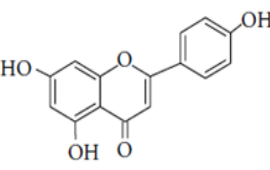
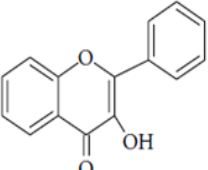
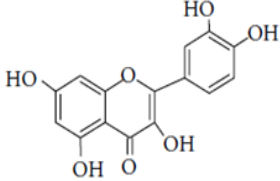
Figura 2: Estrutura básica geral dos flavonoides (KUMAR & PANDEY, 2013).

Naturalmente, a estrutura básica dos flavonoides é uma aglicona, não conjugada a açúcares, mas podem ocorrer na forma de glicosídeos e derivados metilados (KUMAR & PANDEY, 2013). Os flavonoides são geralmente glicosilados por moléculas de glicose ou raminose, mas também podem sofrer glicosilação pela galactose, arabinose, xilose, ácido glicurônico ou outros açúcares. O número de ligações pode variar de um, mais comumente, a três moléculas de açúcar e existem várias posições de substituição possíveis no polifenol, influenciando diretamente as propriedades químicas, físicas e biológicas dos flavonoides (KARAKAYA, 2004).

A atividade biológica dos flavonoides e de seus metabólitos depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações que irão modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos (HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). A estrutura química também influencia na absorção dos flavonoides, que pode ocorrer no intestino delgado ou cólon. A forma aglicona é mais facilmente absorvida no intestino delgado, enquanto a forma glicosídica tem que ser convertida em aglicona no cólon para que ocorra absorção. A absorção dos flavonoides também depende de suas propriedades físico-químicas, entre elas peso molecular, lipofilicidade, solubilidade e pKa (KUMAR & PANDEY, 2013).

Considerando a estrutura dos flavonoides baseada no núcleo de dois anéis fenólicos A e B, o anel central C pode ser um pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis, ou uma pirona, como nos flavonóis e flavonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C. Os flavonóis e flavonas são os compostos mais amplamente encontrados em alimentos e envolvidos em estudos de investigação de efeito biológico (HUBER & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Entre as agliconas mais comuns presente na estrutura dos flavonóis encontra-se a quercetina e, sua estrutura básica, difere da estrutura das flavonas na posição C-3 que é hidroxilada. As flavonas são compostos fenólicos menos encontrados na natureza e suas agliconas mais comuns são a apigenina e a luteolina (Tabela 2) (MANACH et al., 2004).

Tabela 2: Estrutura de duas das principais classes de flavonoides (flavonas e flavonóis). (Modificado de KUMAR & PANDEY, 2013).

CLASSE DE FLAVONOIDES	ESTRUTURA BÁSICA	
FLAVONAS		 LUTEOLINA  APIGENINA
FLAVONÓIS		 QUERCETINA

A análise fitoquímica da *Cecropia hololeuca* mostrou a presença de duas flavonas derivadas da luteolina, a isoorientina e a 2''-O-glicosil-isorientina, e duas flavonas da apigenina, isovitexina e a 2''-O-glicosil-isovitexina. Na classe dos flavonóis foram identificados dois flavonoides derivados da quercetina, a rutina e a isoquercitrina (Tabela 3) (CHAGAS, 2013).

Tabela 3: Estruturas dos principais flavonoides identificados na análise fitoquímica das folhas de *Cecropia hololeuca* por cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE-DAD) (Modificado de CHAGAS, 2013).

FLAVONOIDES/ESTRUTURA QUÍMICA	
FLAVONA/LUTEOLINA	
Isoorientina	2''-O-glicosil-isorientina
FLAVONA (APIGENINA)	
Isovitexina	2''-O-glicosil-isovitexina
FLAVONÓIS (QUERCETINA)	
Rutina	Isoquercitrina

3.2 Potencial terapêutico dos flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos apresentados amplamente distribuídos na natureza (WANG et al., 2018). Devido ao rápido desenvolvimento nas técnicas de espectrometria de massa nas duas últimas décadas, a análise de produtos naturais de baixo peso molecular com propriedades físico-químicas diferenciadas apresentou um avanço significativo, permitindo que mais de 10000 compostos pertencentes a esta classe fossem identificados (KACHLICKI et al., 2016). O enorme interesse na identificação e isolamentos de novos compostos flavonoides se deve aos seus diversos e lucrativos efeitos em sistemas biológicos, entre eles os efeitos antimicrobiano, antidiabético, cardioprotetor, anticancerígeno, anti-oxidante, anti-hepatotóxico e anti-inflamatório (WANG et al., 2018).

Os mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-oxidante dos flavonoides incluem supressão da formação de espécies reativas de oxigênio por inibição enzimática ou pela quelação de oligoelementos envolvidos na geração de radicais livres, eliminação de espécies reativas de oxigênio e regulação de defesas anti-oxidantes. Estes efeitos, ocorrendo de forma isolada ou combinada, inibem a formação de radicais livres que conduzem a processos degenerativos na saúde humana, a ativação de fatores pró-carcinogênicos, a redução de sistemas de defesa anti-oxidante e as alterações na expressão genética, que contribuem significativamente para diversas doenças (MISHRA et al., 2013). Segundo Miltonprabu e colaboradores (2016) as propriedades anti-oxidantes dos flavonoides também são responsáveis pela diminuição das disfunções hepáticas em animais expostos a agentes hepatotóxicos, juntamente com seus efeitos inibidores da apoptose e da inflamação em células hepáticas.

O potencial antidiabético associado aos flavonoides é resultado dos efeitos modulatórios no transporte de açúcar no sangue, no aumento da secreção de insulina, redução da resistência à insulina e modulação da função imunológica para prevenir diabetes, desta forma, desempenhando um papel importante na manutenção dos níveis séricos de glicose (VINAYAGAM & XU, 2015).

Com base em estudos epidemiológicos, dietas ricas em flavonoides estão diretamente correlacionadas ao aumento da longevidade e diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (SALARITABAR et al., 2017). Conforme revisado por Adegbola e colaboradores (2017) o potencial dos flavonoides no tratamento de doenças cardiovasculares envolve a habilidade de diminuir ou impedir a disfunção endotelial, reduzir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e inibir a agregação plaquetária.

Os flavonoides apresentam atividade antibacteriana eficaz contra agentes gram-positivos e gram-negativos, exercida através de múltiplos alvos celulares como a inativação de adesinas microbianas, enzimas e proteínas de transporte do envelope celular, ruptura das membranas microbianas por flavonoides lipofílicos e inibição do metabolismo energético bacteriano (BARBIERI et al., 2017).

Os flavonoides têm demonstrado capacidade de proteção celular contra a progressão de diferentes formas de câncer através da ativação de vias pró-apoptóticas e antiproliferativas, bem como pela inativação de vias anti-apoptóticas como a metaloproteinase tipo 2 (MMP-2) e o gene cicloxigenase-2 (COX-2), amplamente expressos em células tumorais (GARCÍA et al., 2018).

Em relação a atividade anti-inflamatória, estudos demonstram que os flavonoides exercem seus efeitos através de vários mecanismos que incluem a inibição direta ou indireta de citocinas pró-inflamatórias através da imunomodulação das cascatas de sinalização inflamatória, diminuição do recrutamento de células pró-inflamatórias, aumento da atividade anti-oxidante e das funções imunorreguladoras (KELEPOURI et al., 2018).

A inibição da inflamação promovida pelos flavonoides pode ocorrer através do seqüestro e inibição da formação de uma grande variedade de radicais livres, que são capazes de atrair diversos mediadores inflamatórios responsáveis pela resposta inflamatória e dano tecidual (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009). Segundo Rathhe e colaboradores (2009), um importante mecanismo de atividade anti-inflamatória dos flavonoides consiste na regulação da atividade de enzimas, entre elas a proteína tirosina-quinase, proteína quinase C, fosfodiesterase, fosfolipase A2, lipoxigenases e ciclooxigenase. Estas enzimas desempenham papel central na ativação de células endoteliais e numerosas outras células especializadas envolvidas na inflamação.

Os flavonoides são capazes de diminuir a síntese de diferentes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, através de mecanismos moleculares que incluem inibição dos fatores de transcrição NF-kB e proteína ativadora-1 (AP-1), e redução da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (SERAINI et al., 2010). Segundo García-Lafuente e colaboradores (2009), os flavonoides diminuem a produção de óxido nítrico pela inibição da óxido-nítrico sintase (iNOS) durante a resposta inflamatória.

Neste contexto é extremamente importante o desenvolvimento de pesquisas que investiguem o potencial anti-inflamatório dos flavonoides, não apenas para estabelecer mecanismos envolvidos nestas atividades, mas também para descoberta de novos alvos terapêuticos no processo inflamatório, relacionando estrutura e atividade destes compostos fitoquímicos (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009). Os estudos podem ser realizados através de ensaios *in vitro*, em cultura de células que objetivam verificar se o flavonoide é capaz de reduzir ou até mesmo inibir a formação de mediadores, a produção de enzimas e citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Já os ensaios *in vivo* utilizam agentes indutores de inflamação, visando avaliar se o flavonoide é capaz de inibir eventos do processo inflamatório como a formação do edema, o desenvolvimento de hipernocicepção, a migração das células de defesa, bem como a formação de mediadores e enzimas pró-inflamatórias (COUTINHO et al., 2009).

3.3 A Rutina

Em 1930, uma nova substância foi isolada de laranjas, sendo classificada inicialmente como uma vitamina (vitamina P), tendo estudos posteriores demonstrado se tratar de um flavonoide, denominado rutina (NIJVELT et al., 2001). A rutina é um importante flavonoide glicosídico pertencente à classe dos flavonóis, extensamente encontrados na natureza e reconhecidos por apresentar funções clínicas relevantes e potencialmente benéficas na prevenção de doenças (SHARMA et al., 2013). A rutina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona-3-rhamnoglucosídeo) também pode ser chamada de rutosídeo, quercetina-3-rutinosídeo ou soforina e seu nome é uma referência a planta *Ruta graveolens*, que também contém rutina (GANESHPURKAR; SANUJA, 2017-A).

A estrutura química da rutina (C₂₇-H₃₀-O₁₆) envolve a ligação de um dissacarídeo (glicose e ramnose) à posição três no anel pirano da molécula de quercetina. A combinação dessas duas moléculas é denominada rutinose (Figura 3) (GANESHPURKAR; SANUJA, 2017-A). Segundo Kim e colaboradores (2005), esta estrutura confere a rutina, uma hidrofiliabilidade característica dos flavonoides glicosídicos. Conseqüentemente, a rutina não é facilmente absorvida no intestino delgado e uma fração razoável atinge o intestino grosso quando ingerida, onde é metabolizada por glicosidases microbianas para liberação de sua aglicona, a quercetina.

Quanto a toxicidade, Lima e colaboradores (2003) investigaram as propriedades tóxicas da rutina em coelhos hiperlipidêmicos, testando doses de até 600 mg/kg administradas

por via oral durante 28 dias, não sendo encontrados efeitos colaterais quando avaliados os marcadores de dano hepático como transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e os indicadores de função renal como ureia e creatinina.

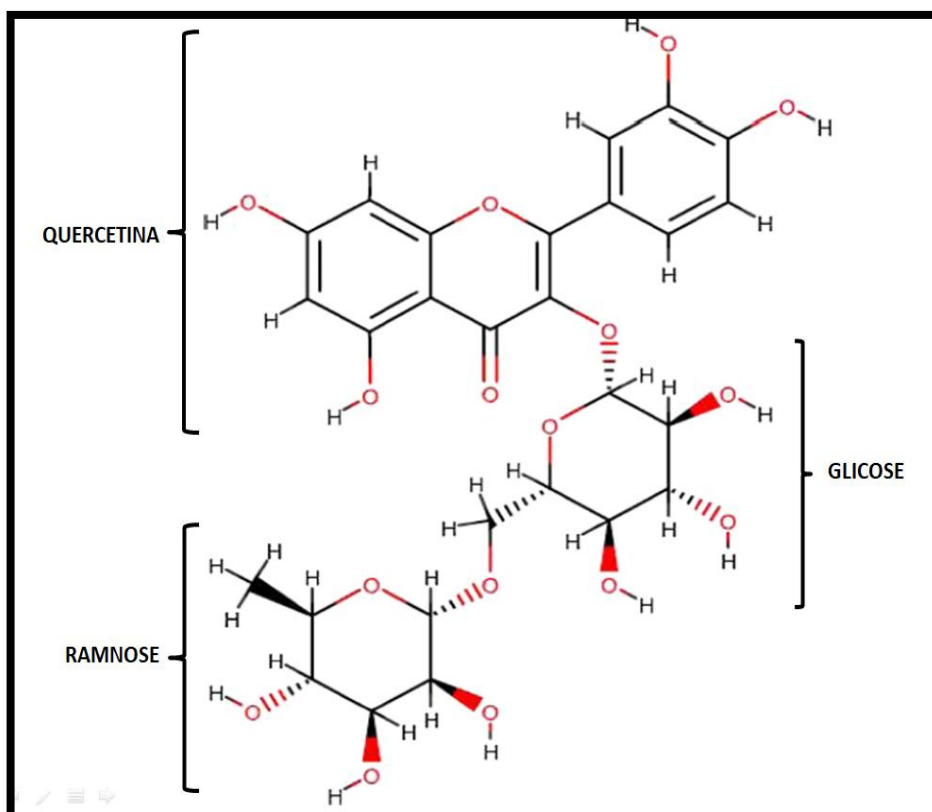


Figura 3: Estrutura química de rutina (Adaptado de GANESHPURKAR; SANUJA, 2017-A).

A rutina apresenta excelentes efeitos terapêuticos, tais como efeito anti-inflamatório, anti-oxidante, anti-alérgico, neuroprotetor e inibidor da agregação plaquetária (MOHAMMAD F et al., 2017). Seu mecanismo de defesa anti-oxidante busca, inicialmente, impedir a formação de radicais livres pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre e, em um segundo momento, interceptam os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e sobre as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular (FREITAS et al., 2014).

Estudos demonstraram que a rutina é capaz de sequestrar radicais superóxido, mantém os níveis de anti-oxidantes biológicos, aumenta a atividade enzimática anti-oxidante *in vitro*, reduz peroxidação lipídica e a concentração citocinas, bem como, evita o comprometimento cognitivo após lesões como hipoxia e isquemia, em modelos de lesões em sistema nervoso central em ratos (XUA et al., 2014). Al Enazi (2013) demonstrou que a diminuição do estresse oxidativo promovido pela rutina foi capaz de inibir a hiperalgisia mecânica avaliada através do método de Randall e Selitto e a hiperalgisia térmica pelo teste de Tail Flick, produzidas pela neuropatia precoce induzida por diabetes.

Abdel-Rahemm (2010) descreveu o efeito gastroprotetor da rutina na avaliação da formação de úlceras e lesões gástricas induzidas por indometacina *in vivo*. Conforme revisado por Ghorbany (2017), diversos estudos apoiam os efeitos benéficos da rutina no estado glicêmico, perfil lipídico e complicações microvasculares e macrovasculares associados a

diabetes. Os mecanismos propostos para esse efeito incluem a inibição absorção intestinal de carboidratos, diminuição da gliconeogênese, aumento da captação de glicose tecidual e estimulação da secreção pancreática de insulina.

Em trabalho desenvolvido por Ganeshpurkar e colaboradores (2017-B) em modelo experimental de imunossupressão induzida antineoplásico, a rutina atenuou significativamente o efeito imunossupressor da ciclofosfamida, atuando como promotor hematopoiético e também estimulando respostas celulares. Segundo o autor, estes resultados são importantes para futuramente estabelecer seus efeitos terapêuticos sobre estados imunodepressivos e em doenças autoimunes.

Em relação a atividade anti-inflamatória da rutina, ela pode ser explicada pela inibição de algumas enzimas chave envolvidas na inflamação e/ou vias de sinalização celular, como ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), proteína quinase C (PQ-C), fosfolipase A2 (FLA2) e fosfoinositídeo 3-quinase (FI3-quinase), que desempenham um papel importante na produção de mediadores inflamatórios tais como leucotrienos e prostaglandinas (revisado por SHARMA et al., 2013).

Em modelo *in vitro* de investigação da atividade de neutrófilos humanos, a rutina inibiu a ativação dos neutrófilos induzidas por phorbol-12-miristato-13-acetato, a produção de óxido nítrico e TNF- α , bem como a atividade da mieloperoxidase, demonstrando o potencial anti-inflamatório da rutina sobre os neutrófilos (NIKFARJAM et al., 2017).

Na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* através do modelo de edema de pata induzida por carragenina mostrou que a rutina promoveu inibição da formação do edema e da migração de leucócitos induzidas pela carragenina (SELLOUM et al., 2003). Em modelo de edema de pata induzido por formalina promoveu a inibição significativa da formação do edema e da liberação do mediador inflamatório IL-1, apresentando valores semelhantes aos produzidos pelo meloxicam, um importante inibidor da COX-2 (MOHAMMAD F et al., 2017).

Arjumand e colaboradores (2011) demonstraram que o pré-tratamento com a rutina diminui a nefrotoxicidade evidenciado pela diminuição do stresse oxidativo, a inflamação renal pela diminuição dos níveis de TNF- α sistêmico e a apoptose de néfrons em modelo de inflamação renal induzida por cisplatina em ratos.

Lee e colaboradores (2012) avaliaram a participação da rutina na manutenção da integridade de células vasculares endoteliais em modelo *in vitro* de inflamação induzida por LPS, através da determinação da permeabilidade, adesão, migração de leucócitos e ativação de mediadores pró-inflamatórios. Nestes experimentos, a rutina inibiu a ruptura da integridade da barreira endotelial, a expressão de moléculas de adesão celular (CAM) e adesão/migração transendotelial de monócitos para células endoteliais humanas, induzidas pelo LPS, apoiando assim sua utilidade como terapia para doenças inflamatórias vasculares. Estudos posteriores revelaram que a rutina suprimiu a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) pelo LPS. No mesmo estudo, este flavonoide demonstrou potencial antinociceptivo *in vivo* em modelo de placa quente, bem como em modelos de hiperpermeabilidade induzida por ácido acético, inibindo o aumento da permeabilidade vascular e reduzindo a migração de células em modelo de migração leucocitária induzida por carboximetilcelulose.

A rutina inibiu a produção sérica de de óxido nítrico e óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) promovidas pela administração intravenosa de LPS em camundongos. (SHEEN et al., 2002). Em modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, a rutina reduziu significativamente a migração de neutrófilos por redução da expressão da quimiocina MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago-2) via inibição da ativação da NF- κ B (CHEN et al., 2014).

Torres-Rêgo e colaboradores (2016) observaram que a rutina inibiu significativamente o edema da orelha induzida por xileno, reduziu a migração celular em modelo peritonite induzida por carragenina e também em modelo de bolsa de ar induzidos por zimosan. Níveis reduzidos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α também foram observados.

Em modelo de doença inflamatória intestinal induzida por 2,4,6-ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos, a rutina administrada por via oral apresentou atividade anti-inflamatória observada pela redução da atividade da mieloperoxidase, um importante indicador do recrutamento de neutrófilos no cólon. A administração via retal de quercetina, metabólito da rutina apresentou resultados semelhantes além de inibir o TNF- α ativado por NF- κ B. Segundo o autor, estes resultados sugerem que a rutina pode atuar como liberador da quercetina no intestino grosso estando o efeito anti-inflamatório na colite relacionado a inibição de TNF- α ativado por NF- κ B em células do cólon (KIM et al., 2005).

Umar e colaboradores (2012) demonstraram que a rutina inibiu a progressão da artrite induzida por colágeno, evidenciando diminuição da formação do edema, da produção de radicais livres na articulação e, dos níveis de óxido nítrico. Nesse estudo, a rutina também inibiu a atividade da elastase mensurada diretamente na cartilagem articular, um importante indicador de inflamação das articulações, que está associada diretamente ao acúmulo e a ativação de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado.

Em estudo desenvolvido por Sun e colaboradores (2017) através da aplicação intra-articular em ratos de complexo adjuvante de Freud, a rutina inibiu de forma dose dependente o edema articular e os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β , sendo evidenciado histologicamente melhora significativa das mudanças na micro-estrutura dos tecidos articulares inflamados mediados pela inibição de NF- κ B. Em outro modelo de inflamação articular a rutina inibiu significativamente o edema de pata induzida septicamente por *Candida albicans*, sendo ainda demonstrada experimentalmente neste trabalho a capacidade da rutina de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos previamente estimulados com LPS (HAN, 2009).

Neste contexto, por apresentar funções clinicamente relevantes e potencialmente benéficas na prevenção de doenças, a rutina tem sido intensamente pesquisada, tendo os resultados interessado constantemente as indústrias farmacêuticas (BECHO et al., 2009).

4. INFLAMAÇÃO

4.1 Considerações gerais

A inflamação é uma reação celular, imune e metabólica à lesão tecidual ou infecção, representando uma resposta vascular normal de defesa do tecido conjuntivo para abolir a causa da injúria e remover células mortas ou comprometidas (MOHAMAD F et al., 2017). A inflamação ocorre através de uma interação complexa entre mediadores celulares, que envolve quimiocinas, enzimas plasmáticas, lipídios e citocinas e, a nível macroscópico, se caracteriza pela presença de rubor, edema, calor e dor na região inflamada promovendo interferência ou alteração da função (AHMED, 2011). Apesar de ser uma resposta fisiológica e benéfica, quando ocorre de maneira descontrolada e inapropriada, tem como consequência a patogênese e progressão de vários distúrbios inflamatórios, tais como doenças cardiovasculares, respiratórias, neurológicas (MOHAMAD F et al., 2017). A resposta inflamatória pode gerar três fases distintas que incluem a fase aguda caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular e a fase subcrônica onde ocorre infiltração leucocitária e de células do sistema fagocitário mononuclear (ROTELLI et al., 2003). Uma vez que o estímulo nocivo é removido, a reação inflamatória pode diminuir, ocorrendo o restabelecimento da estrutura do tecido e sua função fisiológica (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Em situações em que a recuperação da homeostase tecidual é comprometida se estabelece a fase crônica, caracterizada por presença de lesão permanente, com substituição de células funcionais por células fibrosas e afuncionais (ROTELLI et al., 2003).

A princípio, a resposta inflamatória típica pode ser controlada em quatro níveis, correspondente a quatro componentes da via inflamatória: os indutores da inflamação, os sensores que detectam os indutores, os mediadores inflamatórios formados pelos sensores e os tecidos alvo que são afetados pelos mediadores (Figura 4). Cada componente atua de diversas formas, em vias inflamatórias distintas e determinadas pela natureza do evento que desencadeia o processo inflamatório (MEDZHITOV, 2010).

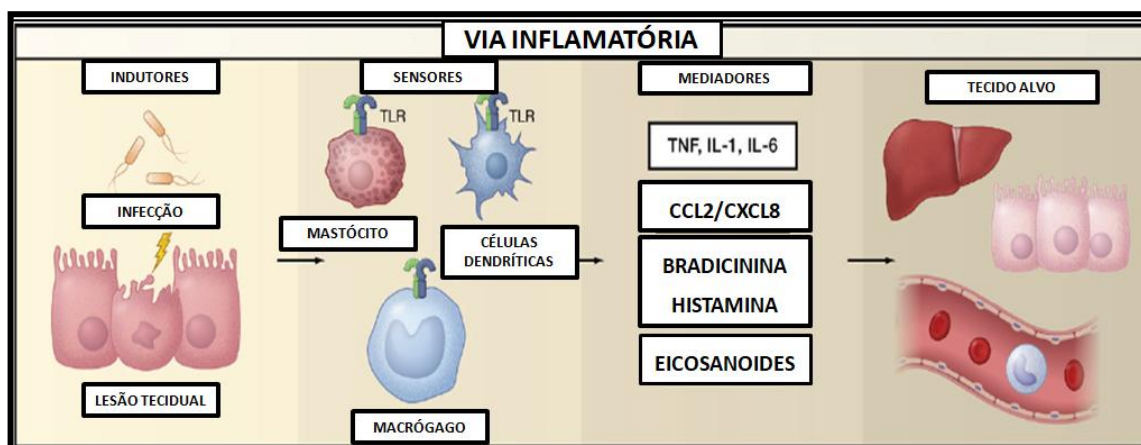


Figura 4: Componentes da via inflamatória (adaptado de MEDZHITOV, 2010).

O primeiro passo da cascata inflamatória é primariamente uma resposta vascular com hiperemia e aumento da permeabilidade da parede vascular. Inicialmente, ocorre vasoconstrição arteriolar transitória promovida pela contração de músculos lisos vasculares. Posteriormente, a vasodilatação arteriolar conduz ao aumento do fluxo sanguíneo para área lesionada resultando em hiperemia local (ALESSANDRI et al., 2013).

A vasodilatação, evento marcante da fase aguda da inflamação, é induzida por diversos mediadores que incluem a histamina, a interleucina-1 β (IL-1 β), as prostaglandinas E2 e I2 (PGE₂ e PGI₂) e o óxido nítrico. Neste estágio inicial, as alterações no endotélio vascular são prontamente detectáveis com consequente exsudação de proteínas plasmáticas e fluído, seguido pela migração de leucócitos da circulação para o tecido acometido (ALESSANDRI et al., 2013). O aumento da permeabilidade vascular ao plasma e proteínas é resultado da ação de mediadores como a histamina, bradicinina que promovem o fluxo de proteínas, eletrólitos e água (exsudato) do leito vascular para o interstício, formando o edema (ARYA & KUMAR, 2005).

A vasodilatação e o edema vêm acompanhados de marginalização, adesão e migração de leucócitos, que fluem seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo (FRANCISCHETTI et al., 2010). No tecido, os leucócitos podem ser ativados e se tornar importante fonte de uma variedade de substâncias que incluem fatores estimulantes de colônias, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, fazendo com que o próprio processo inflamatório possa contribuir para danificar os tecidos adjacentes e portanto, pode aumentar a gravidade dos sintomas (ALESSANDRI et al., 2013).

4.2 Migração de leucócitos

O processo inflamatório frequentemente ocorre em resposta a um estímulo apropriado, como injúrias teciduais ou infecções por microorganismos, que podem ser detectada pelos macrófagos. Estas células fagocíticas presentes nos tecidos, iniciam o recrutamento de outros tipos celulares, através da secreção de citocinas e quimiocinas (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Os neutrófilos constituem o tipo leucocitário mais abundante na circulação, representando o primeiro tipo celular a migrar para o local de inflamação. É a primeira linha de reconhecimento e defesa, iniciando uma inflamação aguda sendo responsáveis por uma resposta imune pró-inflamatória eficaz (ZARBOCK & LEY, 2009). Contudo, estudos recentes descrevem os neutrófilos não somente como o principal tipo celular responsável pelo processo de inflamação aguda, mas como uma célula com potencial modulador dessa resposta, com uma complexa e vasta capacidade de desempenhar funções especializadas, interagindo com macrófagos, células dendríticas, e linfócitos TCD4+ (SILVA, 2015).

Segundo Sadik e colaboradores (2012), o englobamento de agentes patogênicos, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e proteases contribuem para o papel fundamental dos neutrófilos na defesa do hospedeiro. No entanto, os neutrófilos também contribuem significativamente para o dano tecidual em processos de doenças agudas, como contusão pulmonar e lesões da medula espinhal, bem como nos processos de doenças crônicas, como na artrite reumatóide, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma, exigindo um controle rigoroso de seu recrutamento para o tecido e compartimentos e consequentemente do seu potencial destrutivo.

O recrutamento de neutrófilos tem início pela liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, leucotrienos e histamina, por macrófagos residentes no tecido e que causam alterações na superfície endotelial. Os neutrófilos recrutados iniciam uma série de eventos da microcirculação, composta basicamente pelas etapas de rolamento, adesão e transmigração também denominada cascata de ativação neutrofílica (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Este processo é mediado pelo aumento da expressão de selectinas (moléculas de adesão de glicoproteínas), por células endoteliais (P-selectina e E-selectina) e neutrófilos (L-selectina) (ALESSANDRI et al., 2013). Neste momento, ocorre uma ligação de baixa afinidade entre moléculas de adesão presentes nas células endoteliais e nos neutrófilos. Essa ligação entre as moléculas de adesão celular (CAM) faz com que os neutrófilos presentes em grandes quantidades na corrente sanguínea sejam trazidos para a margem do vaso e rolem

sobre as células endoteliais em direção a maior concentração dos estímulos quimiotáticos, diminuindo sua velocidade no fluxo sanguíneo (MAYADAS et al., 2015). Segundo Gomes e colaboradores (2009) o processo de adesão é essencial e ocorre em vários eventos biológicos como: morfogênese, crescimento, organização e estabilidade teciduais, inflamação, resposta do hospedeiro às infecções e injúrias, cicatrização e resposta imunocelular. As CAM funcionam ainda como moléculas sinalizadoras, tendo participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune, além do recrutamento e adesão intercelular, sendo também responsáveis pela migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação e influenciadas por citocinas e outros mediadores inflamatórios.

A ligação de baixa afinidade que promove o rolamento do neutrófilo pelo endotélio vascular fornece a este a capacidade de interagir com fatores quimiotáticos, incluindo o fator de complemento 5a (C5a), IL-8/CXCL8 (quimiocina em humano), CXCL1 e CXCL2 (análogos a quimiocina CXCL8 em camundongos), fator de ativação de plaquetas (FAP), eotaxinas (CCL11) e leucotrieno B4 (LTB4), que se localizam na superfície do endotélio vascular (SALLUSTO & BAGGIOLINI, 2008).

Estes fatores de quimiotaxia ativam receptores específicos nos neutrófilo durante o estágio de rolamento pelo endotélio vascular resultando no aumento da expressão e afinidade das integrinas (família da integrina $\beta 2$ como as $\beta 2\alpha L$ ou CD11a/CD18) presentes nas membranas dos neutrófilos (SILVA, 2015). Segundo Kolaczowska e Kubes (2013) este processo de ativação é facilitado pela ação de citocinas como TNF- α e a IL-1 β .

As integrinas iniciam uma cascata de sinalização intracelular no neutrófilo, interrompendo o rolamento e iniciando um estágio de firme adesão através da ligação com a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) ou molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), presentes na célula endotelial vascular (ALESSANDRI et al., 2013). A interação entre as integrinas e as diferentes moléculas de adesão, entre elas a ICAM-1, ICAM2, VCAM-1, a molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), moléculas de adesão juncional (JAMs) e as moléculas de adesão celular epitelial (ECAM) modulam a transmigração pelo endotélio presente em junções intercelulares (PETRI et al., 2008).

O processo de transmigração de neutrófilos pode ocorrer através do mecanismo paracelular entre as junções das células endoteliais, caracterizados pela presença de moléculas de adesão localizadas em uma região específica da célula que permite a formação de grandes domínios chamados de *transmigratory cup*. Estes domínios exibem um menor contato inter-endotelial, permitindo cercar o neutrófilo e facilitar a transmigração (SILVA, 2015). A via transcelular, que ocorre através da célula endotelial, depende de pequenas passagens associadas à membrana, localizadas nos locais de adesão entre essas células, chamadas de organela vesícuolovaculares. É uma rota utilizada por poucos tipos celulares associado a sítios onde, provavelmente, as junções endoteliais são estreitas ou impenetráveis (Figura 5) (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

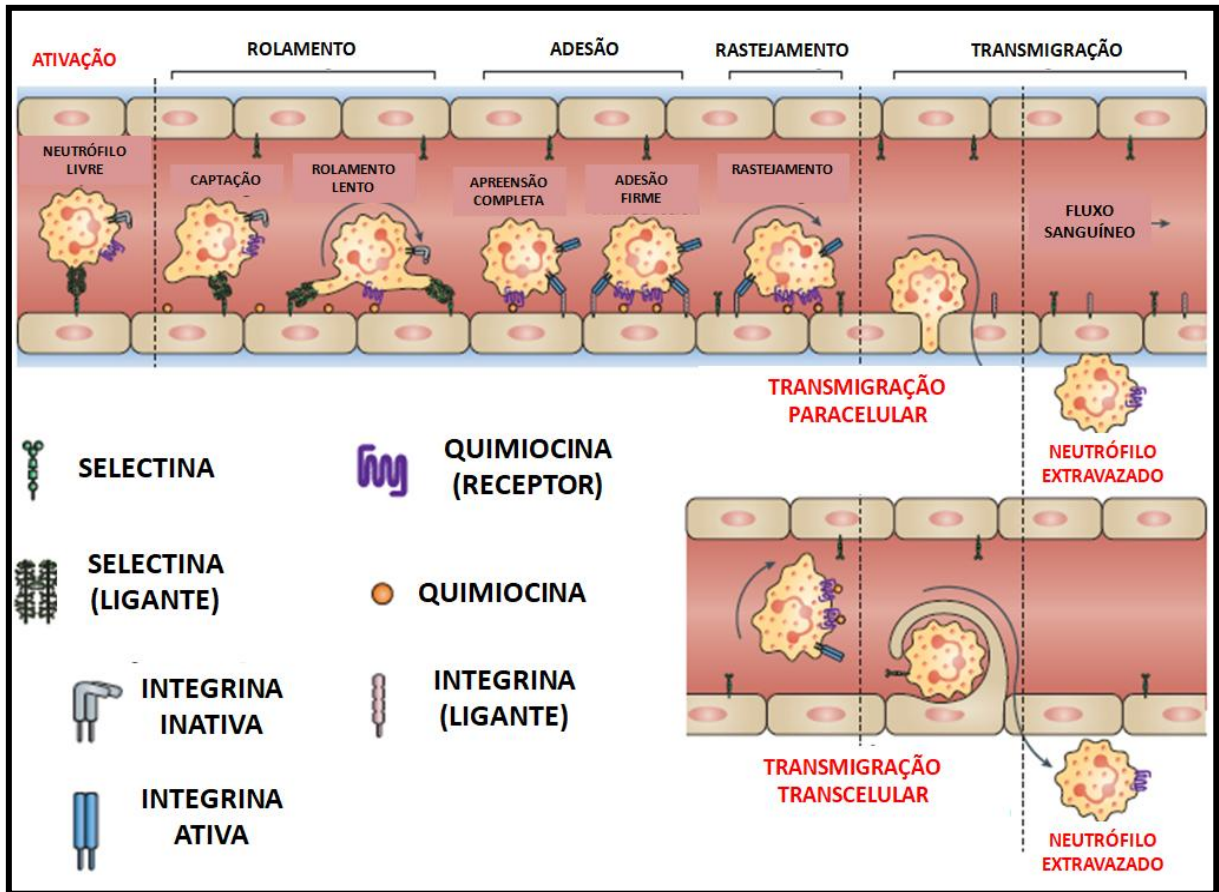


Figura 5: Cascata de recrutamento de neutrófilos onde se destaca a sequência de recrutamento dos neutrófilos da vasculatura para os tecidos, os dois mecanismos possíveis de transmigração de neutrófilos (paracelular e transcelular) e os principais grupos de moléculas de adesão (Adaptado de KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

No tecido, os leucócitos podem ser ativados, se tornando importante fonte de uma variedade de substâncias que incluem fatores estimulantes de colônias, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, fazendo com que o próprio processo inflamatório possa contribuir para danificar os tecidos adjacentes, podendo aumentar a gravidade dos sintomas (ALESSANDRI et al., 2013). Normalmente, a resposta inflamatória inicial para proteger o hospedeiro é auto-limitante e progride para completa resolução devolvendo a homeostase do tecido. Nesse contexto, a apoptose de neutrófilos seguida do reconhecimento e remoção por macrófagos são eventos importantes na resolução da inflamação aguda, e são completadas pela promoção de proliferação celular, síntese de proteínas e remodelamento da matriz extracelular (ORTEGA-GÓMEZ et al., 2013).

Por diferentes motivos, o mecanismo de resolução da inflamação pode estar comprometido ou ser insuficiente, ocorrendo a persistência de neutrófilos no tecido, podendo originar condições patológicas crônicas. Isso ocorre porque no tecido inflamado as citocinas, entre elas o $TNF-\alpha$, formam um microambiente propício a estimular a sobrevivência dos neutrófilos, contribuindo para a cronicidade da inflamação (MAYADAS et al., 2015).

4.3 Mediadores eicosanoides

Os eicosanoides (nome derivado do grego *eicosi* que significa vinte) são poderosos mediadores de lipídios biologicamente ativos oriundos do metabolismo de ácidos graxos poli-

insaturados de cadeia longa (20 átomos de carbono) (KOROTKOVA & JAKOBSSON, 2014). Um desses ácidos graxos, o ácido araquidônico, constituinte das membranas celulares, é o mais abundante e importante precursor dos eicosanoides. A liberação e a mobilização (clivagem) do ácido araquidônico das membranas celulares tornam esse ácido graxo poli-insaturado passível de ser oxigenado (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). Segundo Tracey e colaboradores (2008), embora a clivagem possa ocorrer sem a morte celular, é na lesão e degeneração que ocorre a maior disponibilidade de ácido araquidônico para ser metabolizado, fazendo com que seus metabólitos sejam importantes sinalizadores de estímulos lesivos ou potencialmente lesivos.

Os eicosanoides constituem uma ampla família de compostos formada pelas prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, que são responsáveis por um amplo espectro de atividades fisiológicas (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Esses mediadores lipídicos são produzidos por uma variedade de células, constitutivamente ou em resposta a múltiplos estímulos, como citocinas, fatores de crescimento e traumas. Os eicosanoides formam uma das redes mais complexas de controle de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, muitas vezes em direções opostas. Medeiam respostas biológicas como a integridade gastrointestinal, a homeostase vascular, a perfusão renal e a agregação plaquetária, além de também estarem profundamente envolvidos na regulação da inflamação, auto-imunidade e do câncer (KOROTKOVA & JAKOBSSON, 2014).

A oxigenação do ácido araquidônico é descrita em quatro diferentes vias, catalisadas pelas enzimas cicloxigenase (COX), pela lipoxigenase (LOX), pela epoxigenase e pela via dos isoprostanos (catalisado por peroxidases) (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). Quando ocorre uma lesão na membrana celular, que é constituída fundamentalmente por fosfolipídios, a enzima fosfolipase A2 (FLA₂) presente nos leucócitos e plaquetas é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , degradando os fosfolipídios e resultando na produção de ácido araquidônico (HILÁRIO et al., 2006). Desta forma, o ácido araquidônico passa a se constituir em um substrato para ação de enzimas específica e é submetido a um rápido catabolismo oxidativo através de duas vias enzimáticas distintas envolvendo as enzimas cicloxigenase (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase (5-LO, 12-LO ou 15-LO) (ALENCAR et al., 2005).

A via da cicloxigenase (COX) é reconhecida como uma das principais rotas para a produção de prostanoides bioativos como as prostaglandinas (PG) E₂, D₂, F_{2 α} , I₂ (prostaciclina) e tromboxano A₂ (TXA₂) e exercem suas funções através de duas isoformas diferentes de COX, a COX-1 e a COX-2 (KIM et al., 2013).

A COX-1 é a principal isoforma expressa constitutivamente em níveis elevados, em células e tecidos saudáveis. São responsáveis por gerar prostanoides para diversas funções fisiológicas como manter a integridade da mucosa gástrica, estimular a agregação plaquetária, favorecer a homeostasia vascular e do fluxo sanguíneo renal (ARANDA et al., 2017). A COX-2 também participa da constituição de alguns tecidos específicos desempenhando funções fisiológicas na reprodução, na fisiologia renal, na reabsorção óssea e na neurotransmissão. Porém, sua expressão em repouso é baixa, e são rapidamente estimulados pela ação de mediadores inflamatórios (IL-1, IL-2, TNF- α) após trauma tissular, participando de eventos do processo inflamatório, sendo por isso denominada de forma indutiva (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016).

A COX, também denominada de prostaglandina G/H sintetase, converte o ácido araquidônico em dois compostos intermediários, as prostaglandinas G₂ (PGG₂) e H₂ (PGH₂). Estas prostaglandinas são quimicamente instáveis e em seguida são convertidos por ação de isomerases teciduais específicas em prostaglandinas D₂, E₂ e F_{2 α} . PGH₂ também é metabolizada em dois compostos altamente instáveis e biologicamente ativos com estruturas

que diferem em relação as prostaglandinas primárias, o tromboxano A₂ (TXA₂) e a prostaciclina ou prostaglandina I₂ (PGI₂) (MARNETT, 2009).

As lipoxigenases são di-oxigenases que catalisam a adição de oxigênio molecular em posições específicas dentro dos ácidos graxos poli-insaturados, convertendo o ácido araquidônico em ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE) que por sua vez são convertidos de modo rápido em derivados hidroxí (HETE) ou em leucotrienos (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016). Baseadas nos sítios de inserção do oxigênio na molécula do ácido araquidônico estas enzimas podem ser classificadas como 5, 12 ou 15-lipoxigenases (MOREIRA et al., 2002).

Entre as enzimas destacadas, a 5-lipoxigenase (5-LOX), expressa em granulócitos, macrófagos e mastócitos, atua sobre o ácido araquidônico produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), que é convertido posteriormente em uma forma intermediária e instável, o leucotrieno A₄ (LTA₄). Em seguida, o LTA₄ pode ser convertido por uma hidrolase (LTA₄H) em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou reduzido a forma do cisteinil leucotrieno LTC₄, pela enzima leucotrieno C₄ sintetase (LTC₄S). Os leucotrienos D₄ e E₄ são formado à partir do LTB₄ por peptidases extracelulares (LIU & YOKOMIZO, 2015). As vias enzimáticas de metabolização do ácido araquidônico e formação dos principais mediadores eicosanoides estão ilustrados na figura 6.

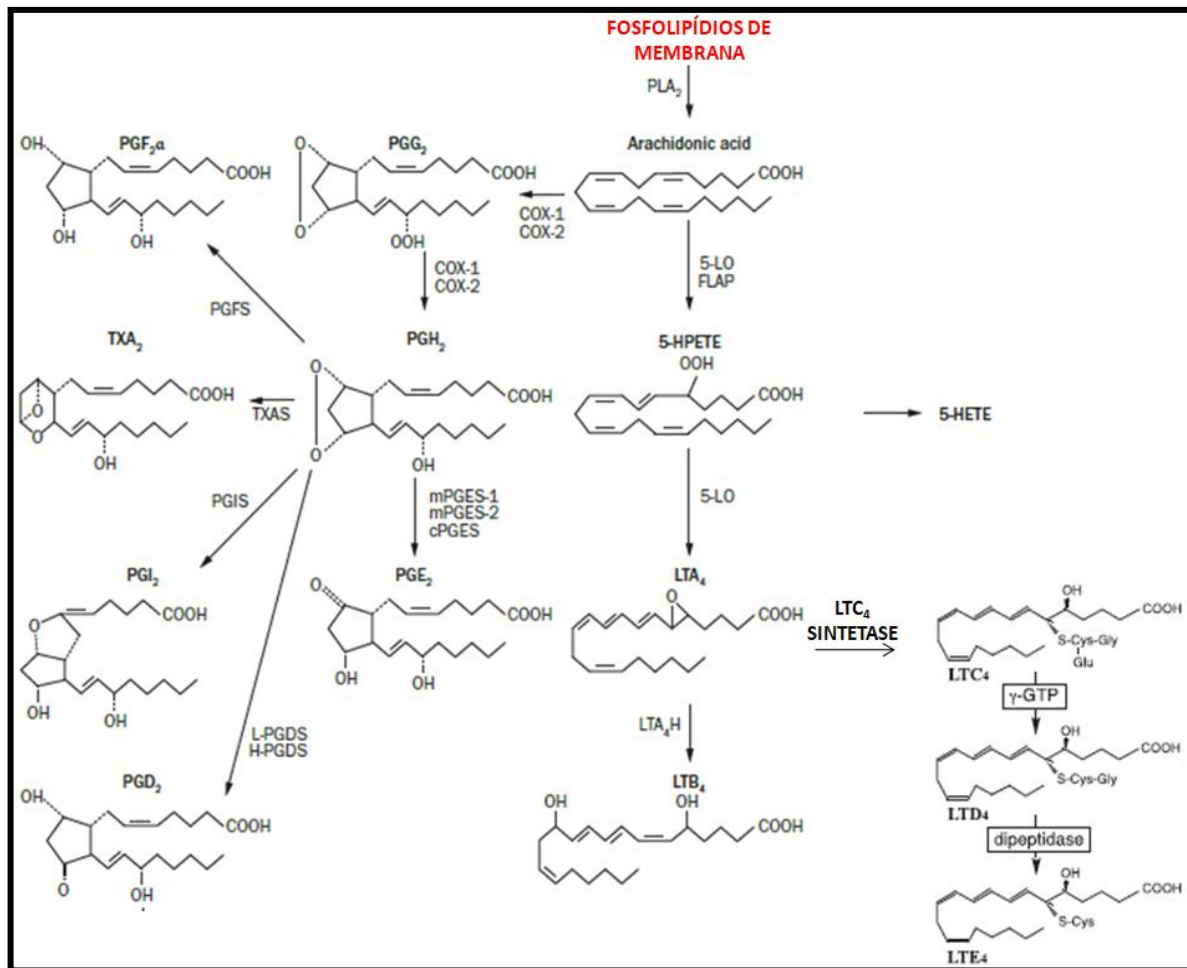


Figura 6: Metabolização do ácido araquidônico e formação de mediadores eicosanoides (Adaptado de KOROTKOVA, JAKOBSSON, 2014).

Os mediadores eicosanoides encontram-se intrinsecamente ligados a dinâmica do processo inflamatório, que cursa com eventos vasculares e celulares e predis põem o

surgimento dos sinais clássicos da inflamação (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Em relação aos prostanoídes, especificamente as prostaglandinas PGE₂ e PGI₂ são os principais produtos da via das cicloxigenases. A PGE₂ é considerada um mediador chave de vários eventos na inflamação, incluindo edema, febre e dor inflamatória (KOROTKOVA & JAKOBSSON, 2014).

Em conjunto com a PGI₂ e a PGD₂, a PGE₂ participa da fase vascular da inflamação promovendo dilatação arteriolar seguido por aumento no fluxo sanguíneo para área lesionada. Posteriormente, ocorre estase sanguínea, aumento na permeabilidade venular pós-capilar e por último, exsudação plasmática, carreando para os tecidos componentes dos sistemas complemento, da coagulação, fibrinolítico e de cininas. Simultaneamente, ocorre a ativação dos eventos celulares com a participação efetiva das células polimorfonucleares e mononucleares, além de seus respectivos mediadores pró-inflamatórios (ALENCAR et al., 2005).

Segundo Ricciotti e Fitzgerald (2011), a ligação de PGE₂ a diferentes receptores pode regular a função de vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B, conduzindo a ambos os efeitos, anti-inflamatório e pro-inflamatório. Como mediador pró-inflamatório, a PGE₂ é implicada na regulação da expressão da citocina e no controle da diferenciação de células T em direção a resposta T helper-1 (Th1) ou T helper-2(Th2).

A nocicepção é resultante ação de PGE₂ em neurônios sensoriais periféricos e centrais localizados na medula espinhal e cérebro (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Segundo Kawahara e colaboradores (2015), estas prostaglandinas ativam fibras aferentes sensitivas e promovem a nocicepção na medula espinhal pela despolarização dos neurônios do tipo WDR (Wide Dynamic Range), além de bloquear a inibição neuronal promovida pela glicina.

Durante a resposta inflamatória, principalmente quando observada no processo infeccioso, certos agentes nocivos como as endotoxinas bacterianas estimulam os macrófagos a liberarem IL-1, um pirógeno endógeno que estimula a síntese de PGE₂. Por sua vez, a PGE₂ causa a elevação do ponto de ajuste da temperatura corporal, sendo por isso considerada o principal mediador da febre no encéfalo (DENNIS & NORRIS, 2015).

A PGI₂ ou prostaciclina é o prostanoíde mais importante a regular a homeostase cardiovascular. Suas principais fontes são células vasculares, incluindo células endoteliais e células da musculatura lisa vascular. Uma vez produzidos por ação das cicloxigenase exercem efeitos locais, agindo em células vizinhas como células vasculares e plaquetas circulantes. Não são armazenados e devido à meia-vida curta são convertidas rapidamente através de um processo não enzimático na forma inativa 6-keto-PGF_{1α} (KAWABE et al., 2010).

A PGI₂ é um potente vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e da adesão leucocitária. Nas células da musculatura lisa vascular apresentam atividade antimitótica, inibidora da síntese de DNA e da sua proliferação. Esta prostaglandina é um importante mediador do edema e da dor que acompanha a inflamação aguda. É rapidamente produzida em consequência da injúria tissular e encontra-se em elevadas concentrações ao redor do tecido inflamado (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Segundo o mesmo autor, a prostaciclina regula a agregação plaquetária promovida pelo TXA₂. Em resposta ao dano vascular, a expressão de COX-2 é induzida em células endoteliais para promover a formação de PGI₂, contrabalanceando os efeitos trombogênicos do TXA₂ mediado por COX-1. Esta regulação torna a prostaciclina peça chave na complexa cascata de prostanoídes em doenças cardiovasculares devido a sua importante atividade anti-aterogênica mediada por COX-2, neutralizando a agregação plaquetária promovida pelo TXA₂.

Os leucotrienos, principal produto da via da lipoxigenase, estão implicados em diversas desordens inflamatórias. As principais propriedades fisiológicas destes eicosanóides oriundas de sua interação com receptores específicos de membrana incluem a

broncoconstrição, o aumento da permeabilidade vascular, a liberação de enzimas lisossômicas, vasoconstrição da musculatura lisa e quimiotaxia e ativação de leucócitos. Enquanto o LTB₄ é um poderoso agente quimiotático e ativador dos neutrófilos, contribuindo para a agregação e aderência de leucócitos ao endotélio vascular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas, os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ causam vasoconstrição intensa, broncoespasmo, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento venular (LIU & YOKOMIZO, 2015).

4.4 Citocinas

Citocinas são moléculas proteicas de baixo peso molecular, hidrossolúveis, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico (DE OLIVEIRA et al., 2011). Atuam em concentrações baixíssimas, sendo sintetizadas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino ou autócrino (ZHANG & NA, 2007), mas também pode apresentar sinalização celular endócrina (VARELLA & FORTE, 2001).

Diversos tipos celulares podem secretar uma mesma citocina, podendo uma única citocina agir em diferentes tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. Outro aspecto importante envolvido na atividade das citocinas é que ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (DE OLIVEIRA et al., 2011), mediando a comunicação intercelular necessária para a integração da resposta em uma variedade de estímulos nos processos inflamatórios e imunomediados (TAYLOR et al., 2004).

Estas substâncias atuam ao se ligarem a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica influenciando a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, bem como regulando a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Além disso, algumas citocinas podem ter ações pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas (RAEBURN et al., 2002).

Conforme descrito por de Oliveira e colaboradores (2011), devido a impossibilidade de classificar as citocinas quanto às células de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL), numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35, fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 e IL-7 e TNF (fator de necrose tumoral) e as anti-inflamatórias incluem a IL-4, IL-10, IL-13 e FTC- β (fator transformador de crescimento β).

4.4.1 Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma potente citocina pleiotrópica pró-inflamatória produzida por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos, células natural killer (NK), células T e B e células tumorais (ANDERSON et al., 2004). Segundo De Oliveira e colaboradores (2011), também está presente nos neurônios e células da glia, desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória quanto na neuropática. O TNF- α medeia a resposta do hospedeiro em condições inflamatórias agudas e crônicas e é um mediador de proteção contra infecção e malignidade (ANDERSON et al., 2004).

Além disso, apesar de sua meia-vida plasmática ser de apenas 20 minutos, é suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar outras citocinas. O TNF- α é um potente indutor de metabolismo muscular, da caquexia por estimular a lipólise e de promover resistência a insulina (TURNER et al., 2014). Outras ações incluem ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE₂, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanoides (DE OLIVEIRA et al., 2011). Cunha e colaboradores (2005) relataram que o efeito hipernociceptivo do TNF- α em ratos foi inibido parcial ou total por anticorpos contra a IL-1 β , IL-6 e IL-8, sugerindo que o TNF- α induz a síntese de outros mediadores da dor e inflamação, após ligar-se ao receptor de membrana e, desta forma desempenham um papel importante na cascata de citocinas e estimulação da síntese de outras citocinas ampliando o efeito hipernociceptivo.

Durante a década de 1980, o TNF- α foi clonado, sequenciado e suas atividades biológicas identificadas. Esta citocina é sintetizada como uma proteína precursora transmembrana com domínio citoplasmático (29 aminoácidos), transmembranar (28 aminoácidos) e extracelular (176 aminoácidos). Após sua clivagem pela enzima conversora de TNF- α (TACE) produz uma forma solúvel de TNF- α (157 aminoácidos). Ambas as formas de TNF- α , solúvel e transmembrana são biologicamente ativas, contudo a forma não-solúvel é pensada para mediar seus efeitos citotóxicos e inflamatórios através do contato célula-célula (LARCHÉ et al., 2005).

O TNF- α efetua suas atividade biológicas através da interação com dois tipos estruturalmente distintos de receptor de TNF- α (TNFR), o TNFR1 e o TNFR2. Ambos são receptores transmembranares semelhantes em seu domínio extracelular, porém não demonstram homologia em seus domínios citoplasmáticos, mais especificamente pela presença de um domínio de morte intracitoplasmático existente em TNFR1 e que se encontra ausente em TNFR2. O TNF- α se liga aos dois receptores com alta afinidade e durante o processo inflamatório a expressão de ambos está aumentada (LARCHÉ et al., 2005). Tem sido descrito que o principal ligante para o TNFR-1 é a forma solúvel de TNF- α enquanto o TNF- α ligado a membrana manifesta seus efeitos biológicos preferencialmente através de ligação aos receptores TNFR-2 (TRACEY et al., 2008).

O TNFR1 é constitutivamente expresso em todas as células, com exceção dos eritrócitos, e o TNFR2 que é geralmente induzido e preferencialmente expresso em células endoteliais e em células hematopoiéticas (TRACEY et al., 2008). A sinalização celular do TNF- α envolve várias vias moleculares tornando o processo de investigação complexo e interessante (PAUL et al., 2006). A ligação do TNF- α ao TNFR leva ao rearranjo do domínio citoplasmático do receptor, permitindo interações com proteínas adaptadoras que iniciam cascatas de sinalização (LARCHÉ et al., 2005).

Inicialmente o domínio morte do TNFR1 recruta outra molécula de sinalização contendo domínio morte homólogos ao do receptor, a proteína de domínio morte associada ao TNFR1 (TRADD), passo fundamental para mediar a morte celular programada ou a ativação de NF- κ B (LARCHÉ et al., 2005; TURNER et al., 2014). Por conseguinte se formam dois complexos de sinalização, um que requer proteína interativa do receptor (RIP) e a proteína fator-2 associado ao TNF- α (TRAF2) para ativar uma cascata de quinases (I κ B quinase 1 e 2) responsáveis por fosforilar proteína inibidora de NF- κ B (I κ B α). Essa proteína é responsável por encobrir os sinais de localização nuclear NF- κ B, mantendo-o sequestrado em um complexo (I κ B α /NF- κ B) inativo no citoplasma. Uma vez liberado deste complexo, o NF- κ B desencadeia a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, expressão de proteínas anti-apoptóticas e inibição de proteínas apoptóticas (LARCHÉ et al., 2005, PAUL et al., 2006) (Figura 7). A ativação do receptor TNFR2 também está associada a formação de TRAF2 intracelular levando a ativação de NF- κ B e conseqüentemente a formação de mediadores como citocinas, quimiocinas e proteases (LARCHÉ et al., 2005).

Alternativamente ao primeiro complexo de sinalização, a proteólise e internalização do receptor promovem o recrutamento da TRADD e envolve a participação da proteína associada ao receptor Fas (receptor de apoptose na superfície das células que leva à morte celular programada) com domínio da morte (FADD) e pro-caspase oito para induzir degradação do DNA e apoptose (TRACEY et al., 2008).

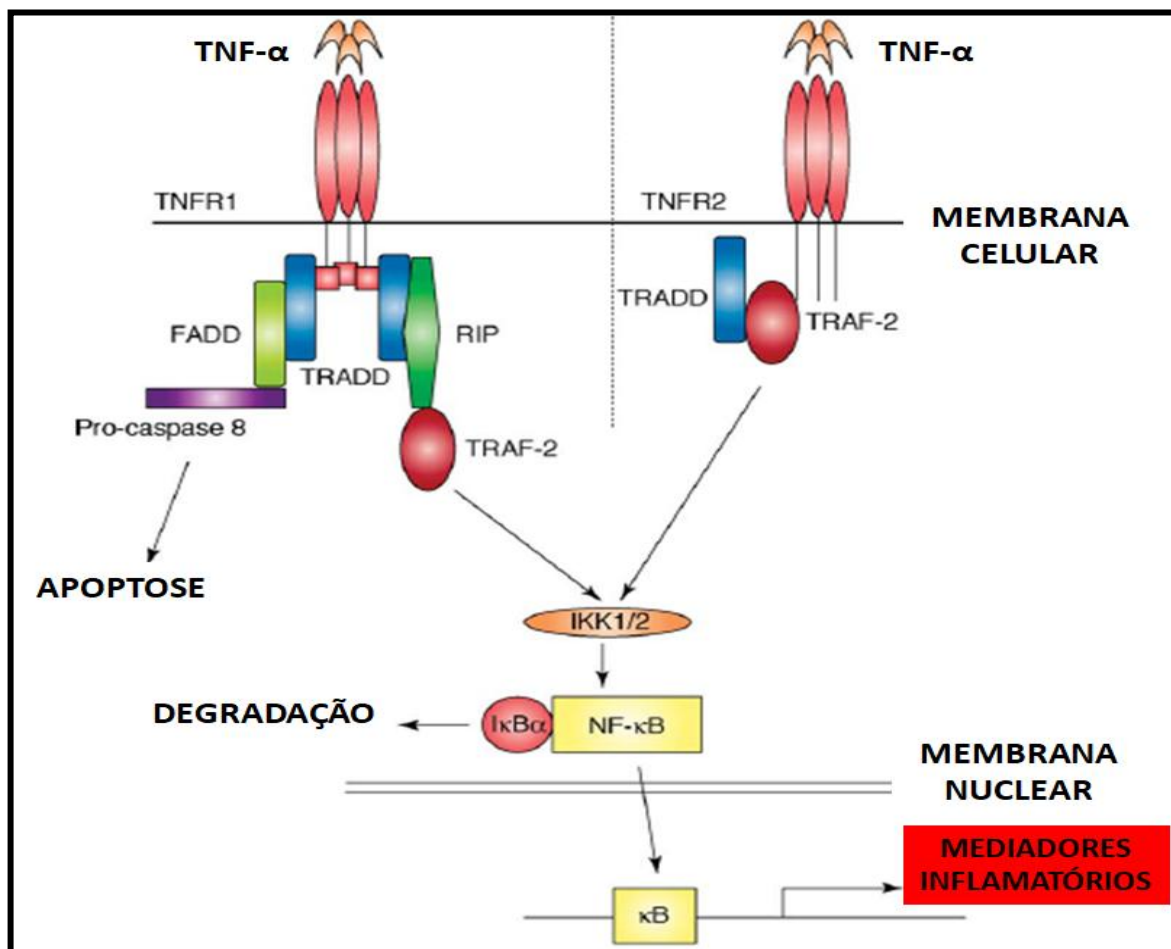


Figura 7: Ilustração simplificada do mecanismo de sinalização de receptores para TNF- α (TNFR1 e TNFR2) (Modificado de LARCHÉ et al., 2005).

Patologicamente a ativação inadequada de NF- κ B em doenças como diabetes, artrite reumatóide, lesão de isquemia-reperfusão, distúrbio respiratório, choque endotóxico e na resposta inflamatória sistêmica foi atribuída ao TNF- α (PAUL et al., 2006). Através da ativação de NF- κ B, o TNF- α induz a expressão de vários genes como da cicloxigenase-2 (COX-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que pode estar envolvido em invasão de tecido e metástase. No processo inflamatório exercem múltiplos efeitos biológicos como indução de moléculas de adesão de leucócitos, de citocinas pró-inflamatórias e a deposição de fibrina, além de produção moduladora de óxido nítrico e regulação da permeabilidade vascular (TRACEY et al., 2008).

Neste contexto fármacos derivados de compostos naturais, isoladamente ou de maneira sinérgica, podem fornecer uma abordagem alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias através da modulação das vias de sinalização do TNF- α (PAUL et al., 2006).

4.4.2 Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Há dois tipos conhecidos, a IL-1 α e IL-1 β , que são capazes de agir sobre dois tipos de receptores, IL-1RI e IL-1RII. Porém apenas o receptor IL-1RI é considerado o receptor ativo, enquanto o IL-1RII não possui uma molécula de transdução e é funcionalmente inativo (ZHANG & NA, 2007).

Enquanto a expressão de IL-1 α é constitutiva em muitos tipos de células, a expressão de IL-1 β é induzida principalmente em resposta a moléculas microbianas, embora possa também estimular sua própria expressão (TURNER et al., 2014). Como membro dessa família de interleucinas se encontra também a IL-1AR (antagonista de receptor) que também é liberada durante lesão tecidual e não tem efeito agonista tanto *in vitro* como *in vivo*. Desta forma, ela ocupa os mesmos receptores da IL-1, atuando como um auto-regulador endógeno da sua atividade (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Segundo Wolf e colaboradores (2008), a IL-1 α é marcadamente associada a membranas celulares e age através de contatos celulares. Já a IL-1 β é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β), que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1. Recentemente, descobriu-se que IL-1 β é expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal. A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação da cicloxigenase-2, com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P, óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial.

A atividade da IL-1 é caracterizada pelo balanço entre inibidores (antagonistas de receptores) e promotores de seus efeitos biológicos. Evidências sugerem que os reguladores negativos são componentes chaves da resolução da inflamação, por isso especula-se que componentes da família da IL-1 possam representar possíveis alvos terapêuticos em estratégias de mediadores de pró-resolução (GARLANDA et al., 2013). Segundo Bannenberg e colaboradores (2010), mediadores de pró-resolução incluem várias famílias de diferentes mediadores locais que estão ativamente envolvidos na depuração e regulação de exsudatos inflamatórios para permitir a restauração da homeostase do tecido.

Desta forma, as estratégias anti-IL-1 tiveram um importante impacto na terapia de distúrbios inflamatórios e, em menor grau, doenças auto-imunes. Estudos em curso sugerem que o bloqueio da IL-1 pode ter um impacto clínico mais amplo em doenças relativamente raras e comuns, contudo, uma melhor compreensão da fisiopatologia da IL-1 com a perspectiva de ferramentas e alvos terapêuticos inovadores, ainda permanecem inexploradas (GARLANDA et al., 2013).

4.4.3 Interleucina-6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SOUZA et al., 2008).

A IL-6 apresenta concentrações plasmáticas detectáveis em até 60 minutos após a lesão com pico entre quatro e seis horas, podendo persistir por 10 dias. Por isso é considerada uma das mais precoces interleucinas, representando um importante mediador na indução e no controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos alérgicos, como trauma, infecção e queimadura (HONG & LIM, 2008).

Estudos descrevem a participação da IL-6 na regeneração tecidual, inflamação e defesa de patógenos, no entanto, a sinalização da IL-6 também é importante como gatilho para o início e a progressão de muitas condições patológicas, como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e sepse, se tornando importante foco de pesquisas de indústrias farmacêuticas (ROTHAUG et al., 2016).

Segundo de Oliveira e colaboradores (2011), o papel da IL-6 como uma citocina pró-inflamatória envolve a maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos, diferenciação e manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células NK. Além disso, ativa astrócitos e microglia, regulando ainda a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração.

A IL-6 está envolvida não apenas na ativação do sistema imunológico, mas também em processos regenerativos, bem como na regulação de metabolismo, na manutenção da homeostase óssea e em diversas funções neurais. Além disso, tem sido crescente o número de trabalhos que demonstram a ambigüidade desta interleucina, por possuir tanto efeitos pró-inflamatórios como anti-inflamatórios, através da redução da atividade do TNF- α e da IL-1 (SCHELLER et al., 2011).

4.4.4 Quimiocinas

As quimiocinas são uma grande família de pequenas citocinas de baixo peso molecular capazes de controlar, via ativação de receptores específicos, a migração e a residência de células imunes. A importância fisiológica dessa família de mediadores é resultado de sua especificidade como indutores do recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos (PALOMINO & MARTI, 2015).

Existem quatro grandes subfamílias de quimiocinas baseadas na posição dos resíduos de cisteínas: CXC, C3XC, CC e C (X= aminoácido e C= cisteína). Como regra geral, membros da família de quimiocinas CXC são quimiotáticos de neutrófilos, e as quimiocinas CC são quimiotáticos de monócitos e subtipos de linfócitos, apesar de existirem algumas exceções (GUERREIRO et al., 2011)

Em relação aos membros da quimiocina CXC, os neutrófilos são os principais tipos de células responsivas pois expressam os receptores CXCR1 e CXCR2, aos quais podem se ligar diferentes tipos de quimiocina CXC (CXC 1,2,5,6,7 e 8). Em uma inflamação aguda iniciada por invasão bacteriana, os neutrófilos são as primeiras células a infiltrarem os tecidos. Os neutrófilos têm um papel essencial durante o controle da infecção, primeiro devido à sua capacidade de fagocitar microrganismos, e segundo por liberarem outros mediadores quimiotáticos, como CXCL1, CXCL8, CXCL9 e CXCL10, os quais recrutam outros leucócitos para os tecidos afetados (DE FILIPPO et al., 2013).

O complexo formado pela ligação da quimiocina ao seu receptor é, geralmente, funcionalmente categorizado dentro de três grupos: inflamatórios, homeostáticos e angiogênicos ou angiostáticos, embora as funções possam se sobrepor. Em doenças de caráter inflamatório como a artrite reumatóide, três características marcantes estão relacionadas a essas funções: acúmulo maciço de células imunes por quimiocinas inflamatórias, organização de estruturas linfoides por quimiocinas homeostáticas e neo-angiogênese por quimiocinas angiogênicas (ou um desequilíbrio entre quimiocinas angiogênicas e angiostáticas). Além disso, há modulação direta da migração e estímulo celular para liberação de mediadores pró-inflamatórios relacionando estas citocinas a diversos aspectos da resposta inflamatória (TAK, 2006).

4.5 Nocicepção

Os primeiros quatro sinais da inflamação, rubor (vermelhidão), calor, tumor e dor, foram relatados por Celsus no século I antes de cristo (SCOTT et al., 2004). A base fisiológica destes quatro sinais foi descrita bem mais tarde por Augustus Waller (1846) e Julius Cohnheim, que em 1867, descobriu a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido e outras alterações vasculares características da resposta inflamatória aguda, como vasodilatação e extravasamento plasmático. O quinto sinal cardinal, a perda da função, foi adicionado no século IXX, por Rudolph Virchow em 1858 (MEDZHITOV, 2010). No final do século seguinte houve um progresso considerável na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Desta forma, atualmente, entende-se que a inflamação não é apenas a soma de sinais clínicos, mas uma rede complexa de sinais integrados entre células do sistema imune e injúrias teciduais (RONCHETTI et al., 2017). A dor é integrante dos primeiros quatro sinais clássicos, se entendendo atualmente que são decorrentes de eventos quimicamente mediados, como alterações locais de fluxo e de permeabilidade vascular, infiltrado de leucócitos e liberação de substâncias algogênicas (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016).

Segundo Verma e colaboradores (2015), uma das funções mais importante do sistema nervoso é fornecer informações sobre a ocorrência ou ameaça de lesões, sendo uma das formas de sinalização feita na forma de dor. Do mesmo modo, como parte da resposta do sistema imunológico, a inflamação é uma reação fisiológica de proteção envolvendo células hospedeiras, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores que se destinam a eliminar a causa de lesão celular, células necróticas e tecidos resultantes do insulto original, iniciando o processo de reparação. No entanto, frequentemente a dor estabelecida permanece além do seu papel protetor, tornando-se condições dolorosas geralmente refratárias aos tratamentos disponíveis.

Em 1979, a IASP (International Association for the Study of Pain) aprovou a definição de dor, que não apenas inseriu as dimensões sensoriais e emocionais da experiência, mas também reconheceu a associação entre lesão tecidual e a dor. Desta forma, tentando fornecer uma caracterização universal da experiência humana, a dor foi definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial (COHENA et al., 2018).

No âmbito da pesquisa experimental com dor em modelos animais, é fundamental entender como a definição básica de dor se diferencia do conceito de nocicepção. A IASP define nocicepção como processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (BARROT, 2012), não considerando o componente emocional ou subjetivo que caracteriza a dor (LOPES et al., 2011). Neste contexto, a nocicepção engloba as respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, podendo ter outros eventos relacionados, como por exemplo, reflexos de retirada da pata, da cauda ou vocalização. Por isso, a dor e o efeito da administração de drogas não podem ser mensurados diretamente, exigindo que em modelos animais de estudos pré-clínicos, a diferença entre dor e nocicepção seja considerada (SANDKÜHLER, 2009).

4.5.1 O processamento nociceptivo

O fenômeno pelo qual o estímulo nocivo desagradável produzido na periferia é transmitido pela medula espinhal, bem como para várias áreas do sistema nervoso central resulta no processamento nociceptivo e, quando associados à resposta emocional e memórias negativas resultam, em última análise, na sensação de dor (KHALID & TUBBS, 2017).

O primeiro passo no processamento da dor é a conversão de um estímulo periférico nas fibras sensoriais nociceptivas em um potencial de ação. O sistema nociceptivo é formado por neurônios aferentes primários, especializados na codificação do estímulo nociceptivo para posteriormente transmiti-lo a medula espinhal e tronco cerebral, chamados de nociceptores (COOK et al., 2017). Consistem em terminações das fibras A δ e C, que podem ser ativadas por estímulos nocivos, entre eles, estímulos mecânicos, térmicos e químicos (RONCHETTI et al., 2017).

As fibras aferentes mielinizadas A δ possuem diâmetro médio e medeiam a dor aguda, rápida e localizada, chamada de primeira dor. Estas fibras mielinizadas diferem consideravelmente das fibras A β , de diâmetro maior, que respondem rapidamente ao estímulo mecânico inócuo. Estudos eletrofisiológicos subdividiram os nociceptores de fibras A δ em duas subclasses. As fibras A δ tipo I respondem a ambos, estímulos mecânicos e químicos, mas possuem alto limiar para estímulo térmico (>50°C). No entanto, uma vez que o estímulo térmico seja mantido, estes nociceptores responderão a temperaturas mais baixas. As fibras A δ tipo II possuem um limiar baixo para estímulos térmicos, mas um limiar elevado para estímulo mecânico, sendo responsável por mediar a primeira dor aguda em resposta ao estímulo térmico nocivo (BASBAUM et al., 2010).

Os nociceptores de fibras aferentes C, amielinizados e de pequeno diâmetro sinalizam a dor pouco localizada ou lenta, chamada de segunda dor (BASBAUM et al., 2010). Os nociceptores de fibras aferentes C são polimodais, isto é, inclui uma população de receptores que respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Estudos sistemáticos das fibras aferentes C descrevem algumas como não responsivas a qualquer intensidade de estímulos mecânico ou térmico, chamados de nociceptores silenciosos. Estas fibras aferentes respondem fortemente mediante a estímulos químicos e desempenham um papel importante quando o ambiente inflamatório altera as propriedades do nociceptor (PERL, 2007).

Os neurônios aferentes primários possuem dois ramos axonais, um periférico e um central, que inervam o órgão alvo e a medula espinhal, respectivamente (BASBAUM et al., 2010). Os corpos celulares dos nociceptores que inervam a cabeça e a face se localizam em gânglios de nervos cranianos, particularmente o gânglio do nervo trigêmeo, enquanto os corpos celulares dos neurônios que inervam o resto do corpo encontram-se no gânglio da raiz dorsal, que se situa na região posterior vertebral ao longo da medula espinhal (COOK et al., 2017).

A nociceção é mediada pela atividade de inúmeros mensageiros moleculares intracelulares e extracelulares, envolvidos na transdução dos sinais no sistema nervoso central e periférico e os nociceptores quando ativados, transmitem a informação através de sinalização química mediada por aminoácidos e neuropeptídeos excitatórios. Os neurotransmissores excitatórios como o glutamato, são liberados em terminais de fibras nervosas aferentes e neurônios do corno dorsal, evocando potenciais de ação nos neurônios do corno dorsal superficial, facilitando a transmissão nociceptiva (GARLAND, 2012). Além disso, mediadores inflamatórios são liberados no local da lesão tecidual, reduzindo o limiar de ativação do nociceptor e permitindo uma facilitação da entrada do estímulo nociceptivo no corno dorsal da medula. Entre estes mediadores inflamatórios encontram-se a acetilcolina, a bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o fator de ativação plaquetária, os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (KHALID & TUBBS, 2017).

As fibras nervosas aferentes primárias se projetam para o corno dorsal da medula espinhal que é organizado anatomicamente e eletrofisiologicamente em lâminas distintas. Os nociceptores de fibras A δ se projetam para a lâmina I, bem como, para áreas mais profundas do corno dorsal, na lâmina V. Os estímulos inócuos conduzidos rapidamente por fibras aferentes A β projetam para lâminas profundas (III, IV e V), enquanto os nociceptores C

projetam-se mais superficialmente nas lâminas I e II. Nas lâminas I e V, neurônios de projeção constituem a principal via ascendente de transmissão do corno dorsal para o cérebro. Estes neurônios estão na origem de múltiplas vias ascendentes nociceptivas, incluindo os tratos espinotalâmicos e espinoreticulotalâmicos, que transmitem informações para tálamo e tronco cerebral, respectivamente (BASBAUM & JESSELL, 2000).

Uma série de outros neurotransmissores estão envolvidos no complexo processo de percepção e na modulação da dor central e periférica. A transdução do sinal nociceptivo através do trato espinotalâmico resulta no aumento da liberação de noradrenalina dos neurônios do *locus coeruleus* projetando a informação nociceptiva ao tálamo, que a transmite ao córtex somatossensorial, ao hipotálamo e ao hipocampo (GARLAND, 2012).

Concomitantemente, os receptores opioides no corno dorsal da medula e substância cinzenta periaquedutal inibem o processamento nociceptivo quando estimulada por opiáceos ou por opioides endógenos, como a endorfinas, a encefalinas ou a dinorfinas. A liberação de os opioides endógenos é amplamente controlada pelo sistema de modulação descendente da dor. O ácido gama amino-butírico (GABA) também está envolvido na modulação central de processamento de dor, aumentando a inibição descendente dos neurônios nociceptivos espinhais (HEINRICHER et al., 2009).

Adicionalmente, o cérebro não permite passivamente a entrada de informações nociceptivas, pelo contrário, são capazes de regular a transmissão sensorial exercendo influências no corno dorsal da medula via projeções medulares descendentes. Como descrito na teoria de controle da comporta, proposta por Melzack and Wall, neurônios localizados na substância gelatinosa no corno dorsal de medula inibem a via de transmissão de fibras aferentes primárias ao tálamo, representando um local de controle do sistema nervoso central na transmissão do impulso periférico (GARLAND, 2012).

4.5.2 Sensibilização periférica

A dor persistente associada a lesões ou doenças pode resultar de alterações nas propriedades dos nervos periféricos, que pode ocorrer como consequência de danos às fibras nervosas levando ao aumento disparo espontâneo, alterações na condução do impulso ou nas propriedades neurotransmissor (BASBAUM et al., 2010). Ao contrário outras modalidades sensoriais, a dor não é a expressão direta de um evento sensorial, mas sim o produto de um processamento elaborado pelo cérebro de uma variedade de sinais neurais e, entre outras classificações, pode ser nociceptiva ou neuropática. A neuropatia é caracterizada por descargas eletroquímicas ectópicas patológicas dos nervos sensoriais envolvidos, desta forma, a lesão, o dano ou a disfunção nervosa direta causam dor neuropática. Dor nociceptiva pode ser uma resposta fisiológica aguda a lesões ou fisiopatológicas na sua origem, devido à inflamação (VERMA et al., 2015).

A sensibilização periférica resulta mais comumente do processo inflamatório e das alterações associadas no ambiente químico da fibra nervosa. Assim, o dano tecidual é muitas vezes acompanhado do acúmulo de fatores endógenos liberados de nociceptores ativados ou células não-neurais que residem ou se infiltram na área lesionada, entre elas mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (BASBAUM et al., 2010). Segundo Coutaux e colaboradores (2005), em média, cerca de 10 a 20% das fibras C apresentam em suas terminações nociceptores latentes que são normalmente inativos e não responde aos estímulos nociceptivos agudos. Estes nociceptores latentes de fibra C sofrem ativação gradual durante a resposta inflamatória, contribuindo ativamente para o desenvolvimento da hiperalgesia primária.

Uma ampla gama de mediadores controla o processo nociceptivo periférico, podendo incluir íons e moléculas simples, como os íons potássio (K^+), os íons hidrogênio (H^+) e o

óxido nítrico, pequenas moléculas orgânicas (ATP), mediadores lipídicos (prostaglandinas), peptídeos (bradicinina) liberados por enzimas proteolíticas produzidas pelo tecido danificado e moléculas proteicas inteiras como o fator de crescimento nervoso (MOMIN & MCNAUGHTON, 2009). De forma notável, os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capaz de reconhecer cada um desses fatores pró-inflamatórios ou agentes pro-álgicos e ativando as vias de sinalização intracelular que medeiam à sensibilização (Figura 8) (BASBAUM et al., 2010).

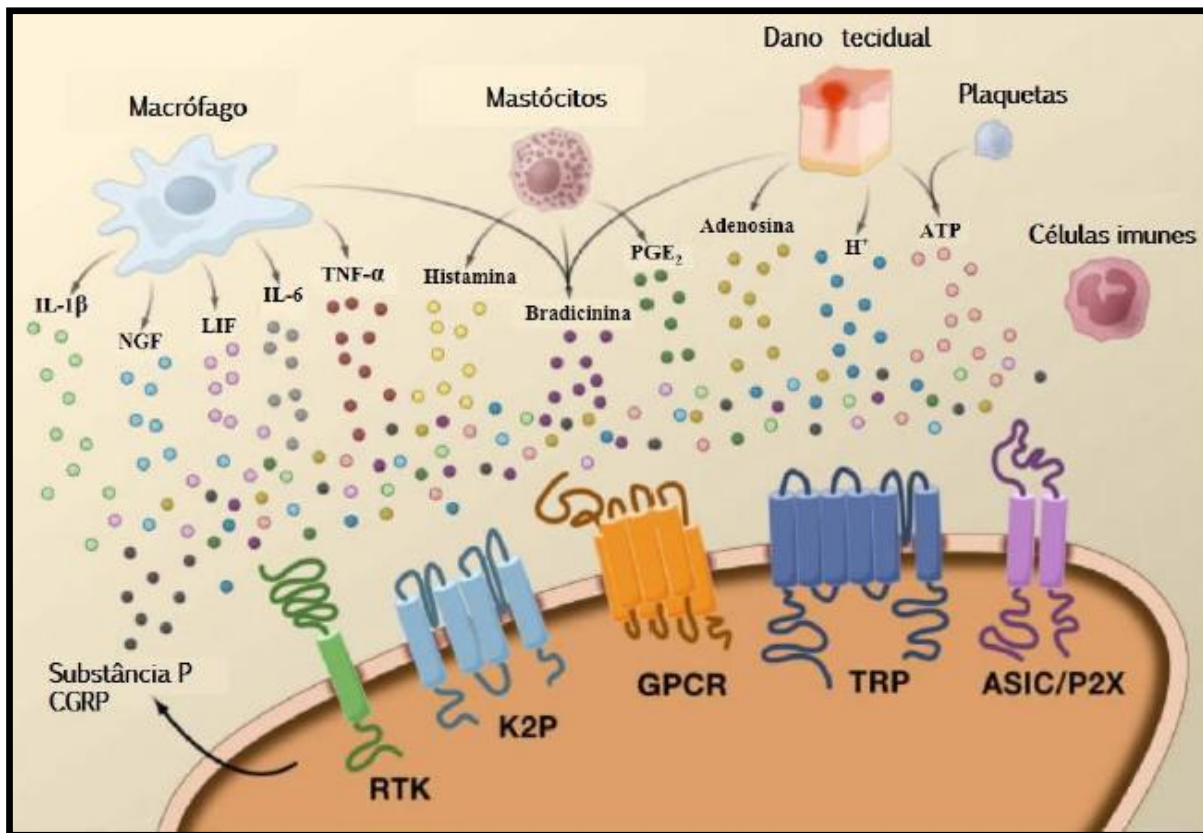


Figura 8: Mediadores periféricos da inflamação e seus respectivos receptores na superfície celular do nociceptor. Os mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, CGRP, bradicinina, eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinoides, NGF, TNF- α , IL-1, proteases extracelulares e prótons) e os receptores se superfície celular: receptor acoplado a proteína G (GPCR), canais potencial receptor transiente (TRPc), canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), canais de potássio de dois poros (K2P) e receptores de tirosina quinase (RTK) (BASBAUM et al., 2010).

Os íons potássio, os íons hidrogênio (H^+) e o ATP são liberados por células danificadas e, juntamente com a bradicinina, são as únicas substâncias endógenas com efeitos excitatórios, enquanto as outras substâncias agem principalmente através de sensibilização. Outras substâncias ativam células residentes teciduais do sistema imune, como mastócitos e macrófagos, que recrutam células sistêmicas, promovendo a sensibilização periférica (COUTAUX et al., 2005).

Os mastócitos são sentinelas e os primeiros a responderem a inflamação periférica, desempenhando um papel crucial em no estabelecimento da dor. Lesões teciduais promovem a liberação de TNF- α e IL-1, levam ao recrutamento de macrófagos e a infiltração de células T, bem como a ativação de citocinas, ATP, bradicinina, fator de crescimento nervoso (que

estimula os mastócitos a liberarem histamina e serotonina) e PGE_2 e PGI_2 que sensibilizam a fibras nervosas A δ e C (VERMA et al., 2015).

Este processo promove o recrutamento de fibras aferentes primárias ativadas ou sensibilizadas que contribuem para o processo nociceptivo através da liberação de neuropeptídeos, entre eles a substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o glutamato (RICHARDSON & VASKO, 2002). Estes mediadores induzem diretamente a vasodilatação com aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, permitindo a extravasamento de plasma e degranulação dos mastócitos. Os grânulos dos mastócitos liberam histamina, que amplifica os processos vasculares, ativa e sensibiliza os nociceptores. Como este evento envolve a participação ativa de fibras aferentes, é denominada inflamação neurogênica (ROSA & FANTOZZI, 2013).

5. OSTEOARTRITE

Osteoartrite (OA), também conhecida como osteoartrose ou doença articular degenerativa, é uma doença das articulações sinoviais caracterizada por deterioração progressiva e perda da cartilagem articular, com mudanças estruturais e funcionais concomitantes em toda a articulação, incluindo o líquido sinovial, menisco no caso do joelho, ligamentos periarticulares e ossos subcondrais (MOBASHERI & MARK, 2016). Segundo Lee e colaboradores (2011-B), a perda de cartilagem articular na osteoartrite é ocasionada por um desequilíbrio entre a formação e a destruição dos seus principais elementos e relacionada com situações distintas, tais como, sobrecarga mecânica, alterações bioquímicas da cartilagem e da membrana sinovial e fatores genéticos. Apresenta um quadro clínico marcado pela dor nas articulações, crepitação, rigidez matinal e atrofia muscular.

A osteoartrite é uma das formas mais comuns, dispendiosas e incapacitantes de doença articular, sendo muito mais comum do que a artrite reumatóide e outras formas de doença articular (MOBASHERI & MARK, 2016). Sua importância cresce anualmente, à medida que se observa um acréscimo da expectativa de vida da população com tendência de aumento de pessoas idosas em relação a indivíduos jovens. Neste contexto, se espera um aumento significativo da prevalência das doenças reumáticas com consequente impacto sobre os serviços de saúde pública e sobrecarga econômica em praticamente todo o mundo (LAIRES et al., 2011).

Desta forma, a osteoartrite insere-se no grupo das doenças reumáticas que é definida como o conjunto de enfermidades, de causa ignorada em sua maioria, que possuem como denominador comum os sintomas dor, reação inflamatória local ou geral acompanhados de restrição dos movimentos. Não são exclusivas de períodos etários específicos da vida e atingem enfermos desde a infância até a senilidade. Além disso, as moléstias reumáticas são altamente incapacitantes, exigindo na maioria das vezes, que os pacientes façam uso contínuo de medicamentos como anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais e analgésicos (DA ROSA & MACHADO, 2007).

Existem vários estudos que avaliam a eficácia terapêutica das plantas medicinais nas enfermidades reumáticas. Contudo, comparados aos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, as plantas medicinais e os fitomedicamentos desempenham ainda um pequeno papel no tratamento de doenças reumáticas e osteoartrites (DA ROSA & MACHADO, 2007).

5.1 Patogênese da osteoartrite

A cartilagem articular é formada por uma abundante matriz extracelular rica em colágeno tipo II que proporciona elevada resistência à tração, e proteoglicanos que contribuem para a resistência à carga compressiva. Além do colágeno tipo II, outros colágenos e proteínas estruturais não-colágenas estão presentes e auxiliam na manutenção da maturidade da matriz extracelular. Em condições fisiológicas os condrócitos são responsáveis pela síntese e pela degradação da matriz extracelular, processo regulado por citocinas e fatores de crescimento (ASHKAVAND et al., 2013), mantendo sua composição, a arquitetura e promovendo um equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação da matriz extracelular, incluindo colágeno tipo II e proteoglicanos (SHERWOOD et al., 2014).

Nos estados patológicos, no entanto, uma interrupção do equilíbrio da matriz leva à perda progressiva do tecido cartilaginoso, expansão clonal de condrócitos nas regiões afetadas, indução de estados oxidativos no ambiente celular, eventualmente, apoptose de células (SHERWOOD et al., 2014, LEE et al., 2013). Estudos recentes apontam que um processo inflamatório inicial, geralmente secundário a lesões causadas por estimulação mecânica da articulação, sejam os responsáveis pelos estágios iniciais envolvidos no mecanismo patogênico da doença (KUYINU et al., 2016).

Basicamente, um insulto inicial a cartilagem articular resulta em liberação de citocinas, entre elas as interleucina (IL)-1, IL-4, IL-9, IL-13 e TNF- α , muitas das quais envolvidas no desenvolvimento fisiológico da cartilagem por células sinoviais e condrócitos (LORENZ, *et al.*, 2006). Em resposta ao aumento na liberação dessas citocinas inflamatórias pelos condrócitos, osteoblastos e sinoviócitos, ocorre um aumento na produção de enzimas degradantes da matriz extracelular entre elas colagenase e metaloproteinases (ADAMTS e MMP) resultando na perda de proteoglicanos e colágeno da matriz. Os altos níveis de TNF- α promovem a adesão de leucócitos ao endotélio vascular sinovial que contribuem para degeneração articular (LEE et al.; 2013; KUYINU et al., 2016).

Os neutrófilos são células predominantes em uma série de artropatias inflamatórias humanas e experimentais e seu papel na patogênese das lesões teciduais induzidas pela inflamação articular é bem reconhecido. Eles não são responsáveis pela perpetuação da sinovite crônica, mas são fonte importante de substâncias que promovem a degradação da cartilagem articular e a reabsorção óssea, entre elas, citocinas, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, enzimas lisossomiais e metaloproteinases (GUERRERO et al., 2008). Segundo Lee e colaboradores (2013), o estresse oxidativo provocado por espécies reativas de oxigênio prejudica ainda mais homeostase da cartilagem articular ao promover catabolismo, induzir a morte celular, regular a produção de enzimas degradantes da matriz, inibir de síntese de matriz extracelular e provocar oxidação de moléculas intracelulares e extracelulares.

5.2 Dor na osteoartrite

Clinicamente, a dor é o sintoma mais importante e incapacitante da osteoartrite e está associada a resultados funcionais inferiores e a redução qualidade de vida em comparação com uma série de outras condições crônicas. A dor artrítica envolve uma integração complexa de processos sensoriais, afetivos e cognitivos que integram uma variedade de mecanismos celulares em ambos os níveis do sistema nervoso, periféricos (articulações) e central (espinhal e supraspinal) (LEE et al.; 2013; LI et al., 2011). O estado fisiopatológico de cada componente na articulação sinovial está ligado à degeneração articular e à percepção da dor relatada. A homeostase local dentro da articulação pode ser perturbada por vários fatores como envelhecimento, lesões e predisposição genética. A inflamação crônica articular não só contribui para o dano acelerado da cartilagem e sinovite, mas também torna a articulação suscetível à sensibilização periférica e, em alguns casos, a sensibilização central (Figura 9) (LEE et al.; 2013).

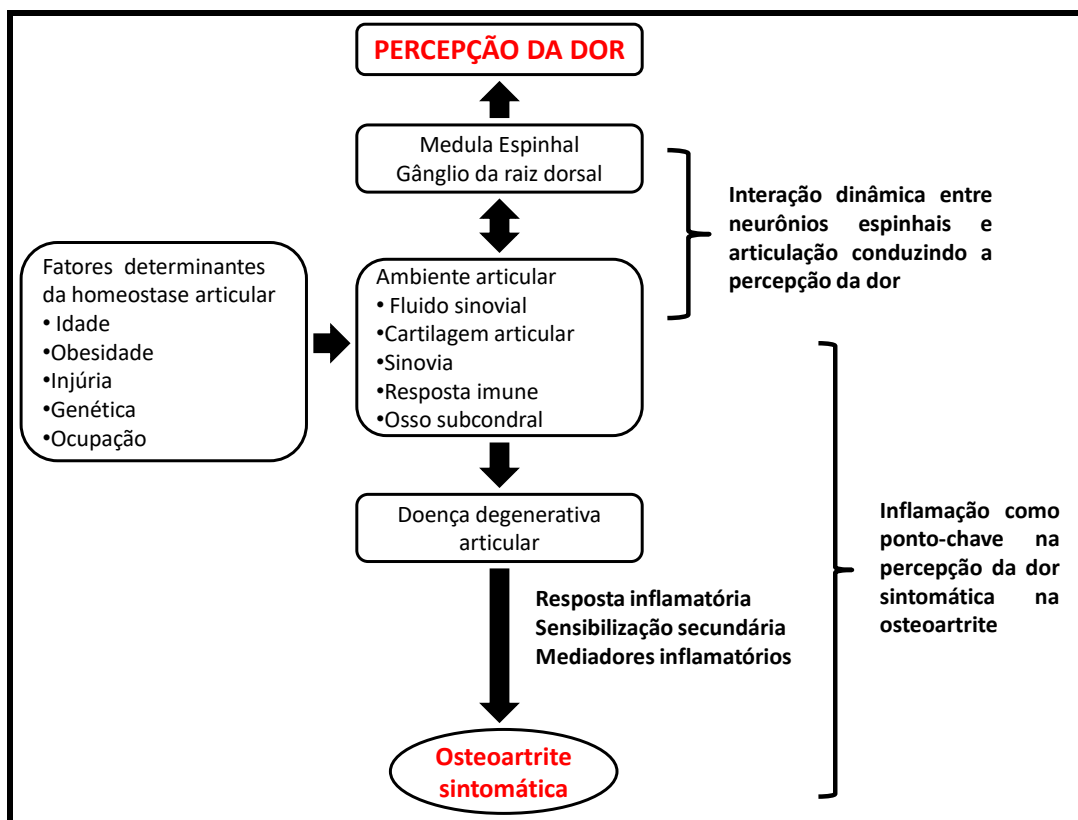


Figura 9: Influência do ambiente articular e dos fatores predisponentes para osteoartrite na integração do processamento sensorial periférico e central da dor (Modificado de LEE et al.; 2013).

A dor aguda adaptativa, como ocorre em lesões pós-cirúrgicas, apresentam função protetora e geralmente desaparece após a regeneração do dano, enquanto a dor crônica inadaptada que persiste além do tempo de cura normal ou por mais de três a seis meses pode ser considerado patológico como um sintoma de doença em curso. À medida que a dor associada à osteoartrite continua, a gravidade e a incapacidade funcional piora devido à falta de medidas prevenção efetivas (LEE et al.; 2013; LI et al., 2011). A dor também pode ocorrer a partir da inflamação inicial da membrana sinovial (sinovite) nesta doença. Esta membrana torna-se progressivamente fibrótica ao longo do tempo (KUYINU et al., 2016). Segundo Lee e colaboradores (2013) mudanças fisiopatológicas em sinoviócitos abrem caminho para angiogênese e inervações, o que também explica a dor causada pela osteoartrite.

Numerosos mediadores inflamatórios contribuem não só para a degradação da matriz extracelular mas também sensibilizam nociceptores localizados ao longo da articulação nos tecidos periféricos a cartilagem, incluindo a cápsula articular, ligamentos, periostéo e osso subcondral e, desta forma, participando da via da dor associadas à osteoartrite. Os estímulos iniciam uma cascata de eventos, incluindo a liberação de citocinas por condrócitos, levando a interações bioquímicas e mecânicas complexas com outros mediadores biológicos para induzir a osteoartrite e promover dor. Exemplos incluem membros pró-inflamatórios da interleucina família (IL-1, IL-6 e IL-17), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e prostaglandina E₂ (PGE₂) (DRAY & READ, 2007; SCHAIBLE et al., 2011).

Estudos recentes sobre a dor induzida pela osteoartrite demonstram que os mediadores pró-inflamatórios periféricos e neuropeptídeos podem sensibilizar os nociceptores do joelho. A plasticidade pro-nociceptiva das citocinas espinhais e neuropeptídeos promovem dor associada à doença. Os canabinoides periféricos e espinhais podem inibir a dor causada pela

osteoartrite, respectivamente, através de receptores CB1 e CB1/CB2. O receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV-1) contribui para dor produzida por estados osteoartíticos. A metaloproteinase-13 (MMP-13) promove redução do dano a cartilagem induzido pelo e alivia indiretamente a dor. Outros produtos químicos bioativos como EROS, iNOS, catepsina K, PGEs, fator de crescimento neuronal e canais de sódio estão envolvidos no processo nociceptivo, bem como os receptores de 5-HT/5HT3 que participa da facilitação descendente supraespinhal (Figura 10) (ZHANG et al., 2013).

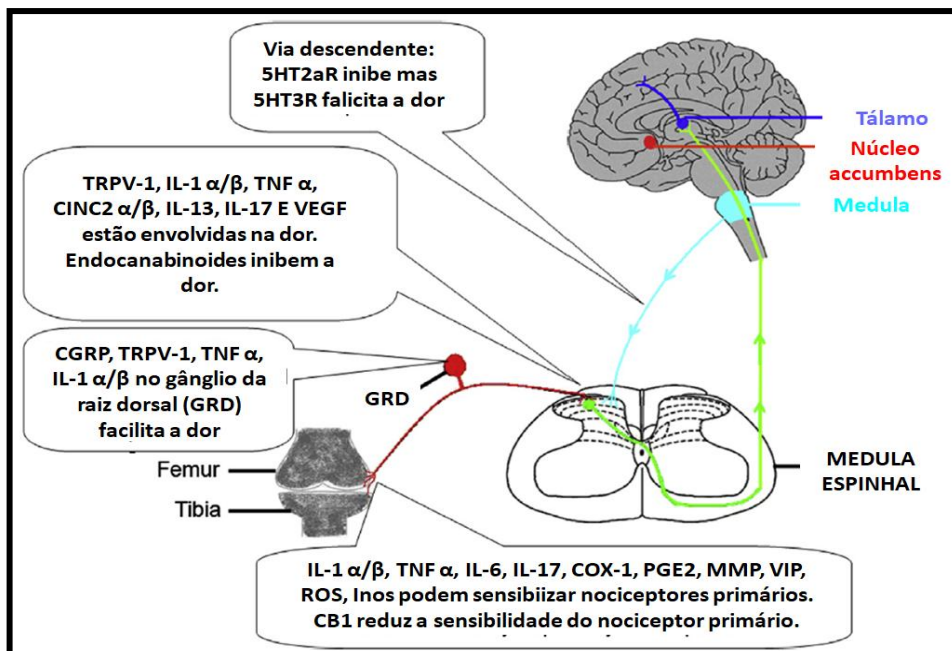


Figura 10: Ilustração dos mecanismos de dor induzida pela osteoartrite nos níveis periférico e central (espinhal e supraespinhal) (Adaptado de ZHANG et al., 2013).

Neste contexto, a dor é a incapacidade física são os principais sintomas para os pacientes que sofrem de osteoartrite, representando um dos maiores encargos de saúde no mundo industrializado. Atualmente as abordagens de manejo de sintomas (medicamentos anti-inflamatório não-esteroides, viscosuplementação, opiáceos, corticoides) são em grande parte inadequados devido à sua eficácia limitada, particularmente para dor em casos de osteoartrite, e pelos efeitos colaterais associados ao tratamento prolongado. Em última análise a dor não responsiva a terapia farmacológica é a motivo principal para a cirurgia de reposição total da articulação e mesmo após este procedimento uma parcela significativa de indivíduos relatam dor persistente de origem desconhecida (MALFAIT et al., 2013).

5.3 Modelos animais para estudo da osteoartrite

Modelos de animais são ferramentas de pesquisa extraordinariamente poderosas para estudo da patogênese e potencial intervenção terapêutica de muitas diferentes doenças. Eles fornecem uma peça chave não apenas no caminho de desenvolvimento do conhecimento, mas também contribuem significativamente para converter o conhecimento desenvolvido em projetos de descoberta de novos fármacos (LITTLE & ZACK, 2012). Modelos animais atualmente utilizados para o estudo de osteoartrite vêm preenchendo deficiências consideráveis em nosso conhecimento exigindo que a pesquisa clínica em pacientes com osteoartrite seja complementada por estudos em modelos animais específicos para doença (PIEL et al, 2014).

As informações atuais sobre a osteoartrite vêm de ambos os estudos, clínicos e pré-clínicos, que quando combinados, provaram ter valor inestimável para caracterizar o desenvolvimento da osteoartrite. Estudos clínicos isolados apresentam várias limitações, principalmente por não ser possível estabelecer precisamente uma relação entre o início da doença e o aparecimento dos sintomas. Neste contexto, os modelos pré-clínicos cumpriram duas importantes metas na pesquisa da osteoartrite ao estudar a patogênese da doença e também ao investigar a eficácia das diferentes modalidades de tratamento, sem os quais, as limitações dos ensaios clínicos teriam impedido avanços médicos atuais no entendimento da osteoartrite (KUYINU et al., 2016).

Contudo, segundo Malfait e colaboradores (2013), embora a compreensão das vias celulares e moleculares que regulam a gênese e a progressão do dano articular estrutural na osteoartrite tenha avançado enormemente como resultado da aplicação de modelos animais, o número de trabalhos de pesquisa especificamente destinados a avaliar os mecanismos de dor e a dor em modelos animais de osteoartrite ainda são surpreendentemente pequenos, em relação à extensão do problema médico que a doença representa.

Piel e colaboradores (2014) descrevem que, apesar de haver semelhanças no processo da doença entre animais e humanos, apenas um modelo animal não é suficiente para estudar todas as características da osteoartrite. A interpretação dos resultados de cada um dos modelos e sua tradução para a condição clínica humana apresenta variações, por isso inúmeros modelos foram desenvolvidos e relatados extensivamente na literatura para estudar várias características desta patologia. A rigor, um modelo ideal de artrite deveria preencher os seguintes requisitos: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na artrite, ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso, ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na artrite, ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividade mensuráveis. Nenhum dos modelos atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido (SILVA JUNIOR & ROCHA, 2006).

Os modelos de indução química, em particular, eliminam a necessidade de cirurgia e evitam a possíveis problemas de infecção em alguns animais, sua facilidade de indução e reprodutibilidade são vantajosas na concepção de estudos à curto prazo e, por apresentarem uma fisiopatologia única, são usados principalmente para estudar o mecanismos de dor associado a osteoartrite, bem como, possíveis alvos para terapia farmacológica (LAMPROPOULOU-ADAMIDOU et al., 2014).

5.3.1 Artrite induzida por zimosan

O zimosan é um polissacarídeo oriundo da parede de uma espécie de fungo chamado *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância capaz de ativar macrófagos e induzir a liberação de mediadores inflamatórios, amplamente utilizadas em diversos modelos de investigação farmacológica. Possui a capacidade de induzir inflamação quando aplicado na articulação de ratos, camundongos e coelhos, com proliferação subaguda e persistente da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da artrite (KEYSTONE et al., 1977; ROCHA et al., 2004). Vêm sendo empregado frequentemente na padronização do estudo da hipernocicepção na fase aguda, além da quantificação da lesão da cartilagem articular, através da determinação da perda de glicosaminoglicanos da matriz, à medida que prossegue a artrite (SILVA JUNIOR & ROCHA, 2006)

Conforme descrito por Silva Junior e Rocha (2006) a injeção intra-articular de zimosan promove sinovite erosiva grave com fase aguda ocorrendo até três dias após a indução e promovendo aumento de permeabilidade vascular e migração celular. Em seguida,

desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica lembrando a sinovite crônica que caracteriza o pannus reumatóide. Na fase crônica do modelo, até 28 dias após a injeção do zimosan, observa-se persistência da sinovite, havendo formação de células gigantes, ao lado de intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia. As células gigantes podem ser observadas a partir dos 14 dias, levando à lise da cartilagem articular e do osso subcondral.

Inicialmente, a inflamação associada à injeção do zimosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local. Porém pesquisas utilizando camundongos *knockout* para o receptor do tipo type II toll-like receptors, demonstrou que houve redução significativa da sinovite, quando comparados a animais normais. Esse resultado sugere um importante componente de imunidade adquirida participando na fisiopatologia da artrite induzida por zimosan. (FRASNELLI et al., 2005).

Em modelos animais, injeções intra-articulares de zimosan promovem respostas inflamatórias locais e sistêmicas. Enquanto dor e edema são as principais características locais da inflamação a elevação duradoura da temperatura corporal é uma das características da inflamação sistêmica. A diminuição da temperatura da pele da cauda seguida por um aumento da temperatura retal são importantes sinais fisiológicos do aumento da temperatura corporal que ocorre durante a integração da resposta febril provocada pela injeção zimosan. Essa resposta febril dura dez horas e não depende de vias neurais, conforme demonstrado pela excisão do nervo ciático, associada ao aumento de concentração central de prostaglandina E₂ (PGE₂) e a sensibilidade à drogas antipiréticas (KANASHIRO et al., 2009).

A administração intra-articular de zimosan em ratos promove artrite com incapacidade articular ocorrendo duas horas após a administração da zimosan e com pico entre a terceira e quarta hora. Também promove aumento significativo na permeabilidade vascular a partir da terceira hora o que leva a formação de edema local (ROCHA et al., 1999). Neste teste, entende-se que a incapacidade articular é aceita como uma devida alteração na nocicepção após injeção do um estímulo inflamatório por via intra-articular (ROCHA et al., 2002). O teste de incapacitação articular para ratos foi desenvolvido para estudar a incapacidade articular, definida como a inabilidade de um animal (rato) para deambular, depois de submetido à injeção intra-articular de um agente inflamatório (TONUSSI & FERREIRA, 1992).

Pesquisas desenvolvidas por Rocha e colaboradores (2002) mostraram resultados da associação entre a evolução e gravidade da sinovite na artrite induzida por zimosan com a redução na quantidade de glicosaminoglicanos na matriz da cartilagem, de tal maneira que a partir dos sete dias de artrite essa quantidade foi significativamente menor em comparação aos valores basais, persistindo reduzida até os 21 dias de artrite. Em resumo, a artrite induzida por zimosan permite demonstrar o efeito de mediadores inflamatórios tanto em uma lesão funcional (hipernocicepção) quanto em uma lesão estrutural (lise da cartilagem articular) em artrites. Além disso, o baixo custo, boa reprodutibilidade e acessibilidade desse modelo constituem, requisitos fundamentais que possibilitam desenvolver pesquisas relevantes e originais em reumatologia (SILVA JUNIOR & ROCHA, 2006).

6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os poucos estudos envolvendo as propriedades biológicas da *Cecropia hololeuca* em comparação com outras espécies do gênero *Cecropia*, bem como os relatos a respeito do seu uso popular em doenças que cursam com dor e inflamação, evidenciam a importância da investigar as propriedades fitoquímicas e o potencial farmacológico desta espécie. Adicionalmente, estas informações podem colaborar, futuramente, com a prospecção de novas estruturas moleculares bioativas que permitam a obtenção de novos fármacos com importância na terapêutica do controle da dor e da inflamação, associado a mínimos efeitos colaterais.

Considerando estes aspectos, este projeto teve como objetivo investigar as propriedades farmacológicas *in vivo* de extratos, frações e do composto flavonoide isolado de *Cecropia hololeuca* usando modelos que avaliam efeitos antinociceptivo, anti-edematogênico, anti-inflamatório e anti-artrite em camundongos..

Os objetivos específicos foram:

- Identificar e isolar compostos presentes nas folhas de *Cecropia hololeuca* em colaboração com o grupo de pesquisa fitoquímica da Prof^a Dr^a Sônia Soares Costa do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (LPN-Bio) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ);
- Investigar as propriedades anti-edematogênicas, antinociceptivas e anti-inflamatórias dos extratos e frações ativas através de testes de atividades farmacológicas *in vivo*;
- Promover os mesmo ensaios farmacológicos para o composto flavonoide identificado, a rotina.
- Determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com as atividades farmacológicas, através da dosagem de TNF- α *in vitro*.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Material botânico

Em fevereiro de 2011, uma amostra de folhas de um espécime masculino florido de *C. hololeuca* foi coletada no Parque Nacional da Tijuca, no caminho para a Vista Chinesa, na cidade do Rio de Janeiro (RJ). A exsicata do material vegetal foi depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, com código de registro RB 555135. Esta parte do trabalho teve a colaboração do Dr. Marcelo Vianna Filho, pós-doutorando do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (CHAGAS, 2013).

Para a secagem, as folhas foram dispostas nas bancadas do laboratório sob ambiente de ar condicionado durante 10 dias (Figura 11). Posteriormente, as folhas secas foram trituradas em liquidificador industrial de inox (Croydon, 2 litros), obtendo-se ao final 400g de material vegetal. Este material ficou armazenado sob temperatura ambiente até o preparo do extrato (CHAGAS, 2013). Todo processo de preparação do material vegetal, bem como a etapa seguinte de prospecção fitoquímica foi realizada sob orientação da Prof^a Dr^a Sônia Soares Costa do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (LPN-Bio) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Figura 11 Amostras de inflorescências e folhas de uma espécime masculina de *Cecropia hololeuca* (CHAGAS, 2013).

7.2 Prospecção fitoquímica

Uma amostra desse material foliar (400 g de folhas secas e moídas) foi extraída por infusão (5% p/v) e, após o processo de filtração e liofilização, obtivemos 59,2 gramas do extrato aquoso bruto (EACH), um rendimento de 14,8%.

Em seguida, com base em estudos anteriores com folhas de *Cecropia glaziovii* (TANAE et al., 2007), foi realizada a partição do extrato aquoso bruto (EACH) com *n*-butanol a fim de gerar uma fração orgânica rica em substâncias fenólicas. Nesta etapa da extração, após solubilização em água destilada parte do extrato aquoso bruto de *Cecropia hololeuca* (44,28 g) produziu uma fração butanólica (FBuCH: 17,1 g) e uma fração aquosa residual (FAqCH: 26,71 g), com rendimentos de 38,61% e 60,32%, respectivamente.

A próxima etapa da prospecção fitoquímica foi a purificação cromatográfica da fração butanólica (FBuCH) onde 11,63g desta fração passou por cromatografia de injeções múltiplas em uma coluna de fase reversa usando um sistema de múltiplos estágios de água

destilada e etanol como fase móvel (0%, 10%, 30%, 50%, 70% e 100% de EtOH). A separação foi monitorada por TLC. As amostras obtidas com cada gradiente de etanol foram liofilizadas separadamente, produzindo as frações F1-F6 (6,95g, 1,20g, 1,93g, 191mg, 19mg e 15mg, respectivamente).

O perfil químico fração butanólica e das frações F1-5 foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), utilizando como fase estacionária uma coluna de RP-2. Analisando os cromatogramas destas frações observou-se que apenas a fração F2, concentrava os quatro flavonoides majoritários presentes de maneira significativa na fração butanólica. As frações F1 e F3 continham apenas resquícios destes flavonoides ou flavonoides minoritários. O perfil químico de F4 e F5 mostrou que nestas frações não havia substâncias de interesse para este estudo. A fração F6 não foi analisada pelo baixo rendimento em massa. Como os flavonoides foram detectados principalmente na fração F2 eluída com 10% de etanol justificou a escolha desta fração para mais avaliações de atividade anti-inflamatória e investigação química considerando o potencial anti-inflamatório dos flavonoides relatados em literatura.

As análises CLAE-DAD indicaram que o F2 era constituída principalmente em uma mistura de flavonas (1, 2, 3, 5), glicosídeos de flavonol (4, 6) e dois compostos fenólicos adicionais (7, 8) (Figura 12-A).

As absorções de UV características sugerem a presença de luteolina nos picos 1 e 2 e apigenina nos picos 3 e 5. Luteolina e apigenina foram descritas em algumas espécies de *Cecropia*, mas os C-glicosídeos são ainda mais comum no gênero. De fato, orientina (luteolina-8-C-glicosídeo), isoorientina (luteolina-6-C-glicosídeo), vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) e isovitexina (apigenina-6-C-glicosídeo) foram propostas como marcadores químicos para a avaliação da qualidade das folhas de plantas deste gênero, juntamente com outros compostos como ácido clorogênico, rutina, algumas catequinas, procianidinas, esteroides e triterpenoides (RIVERA-MONDRAGÓN et al., 2017). A orientina, isoorientina e isovitexina foram especificamente relatadas para *Cecropia hololeuca* (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001).

Os espectros UV dos picos 4 e 6 são compatíveis com alguns derivados de quercetina, especialmente aqueles substituídos em C-3. Entre estes, a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) e isoquercitrina (quercetina-3-O-glicosídeo) foram descritas no gênero *Cecropia*. Embora a isoquercitrina não tenha sido proposta como marcador químico, foi relatado em *C. glaziovii* e *C. pachystachya* (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001) (Figura 12-B e Tabela 4).

Finalmente, os espectros de UV dos picos 7 e 8 mostraram uma única banda de absorção cada, indicando a presença de compostos fenólicos com extensão limitada de conjugação de elétrons em seu cromóforo. As catequinas e as procianidinas são compatíveis com este tipo de espectros de absorção UV (CHAGAS, 2013) (Figura 12-C).

A superfície da amostra eluída com 10% de etanol (286 mg) foi ainda fracionada numa coluna Fine Sephadex G-25(Pharmacia Fine Chemicals, 22g; 43x1,6cm) eluída com água destilada. Ao final da eluição, a coluna foi lavada com 50% de etanol para recuperar alguns compostos aderentes. As amostras contendo os perfis característicos de TLC de flavonoides foram reunidas para formar a fração F2-A (125,3mg) e o restante foi combinado em F2-B (149,7mg), com rendimentos de 43,8% e 52,3%, respectivamente. Para facilitar o entendimento dessa etapa da prospecção fitoquímica denominamos a fração F2 de fração enriquecida em flavonoides (FEFCH) e, os compostos originados do seu fracionamento, F2-A de fração flavonoídica (FFCH) e F2-B de SCH.

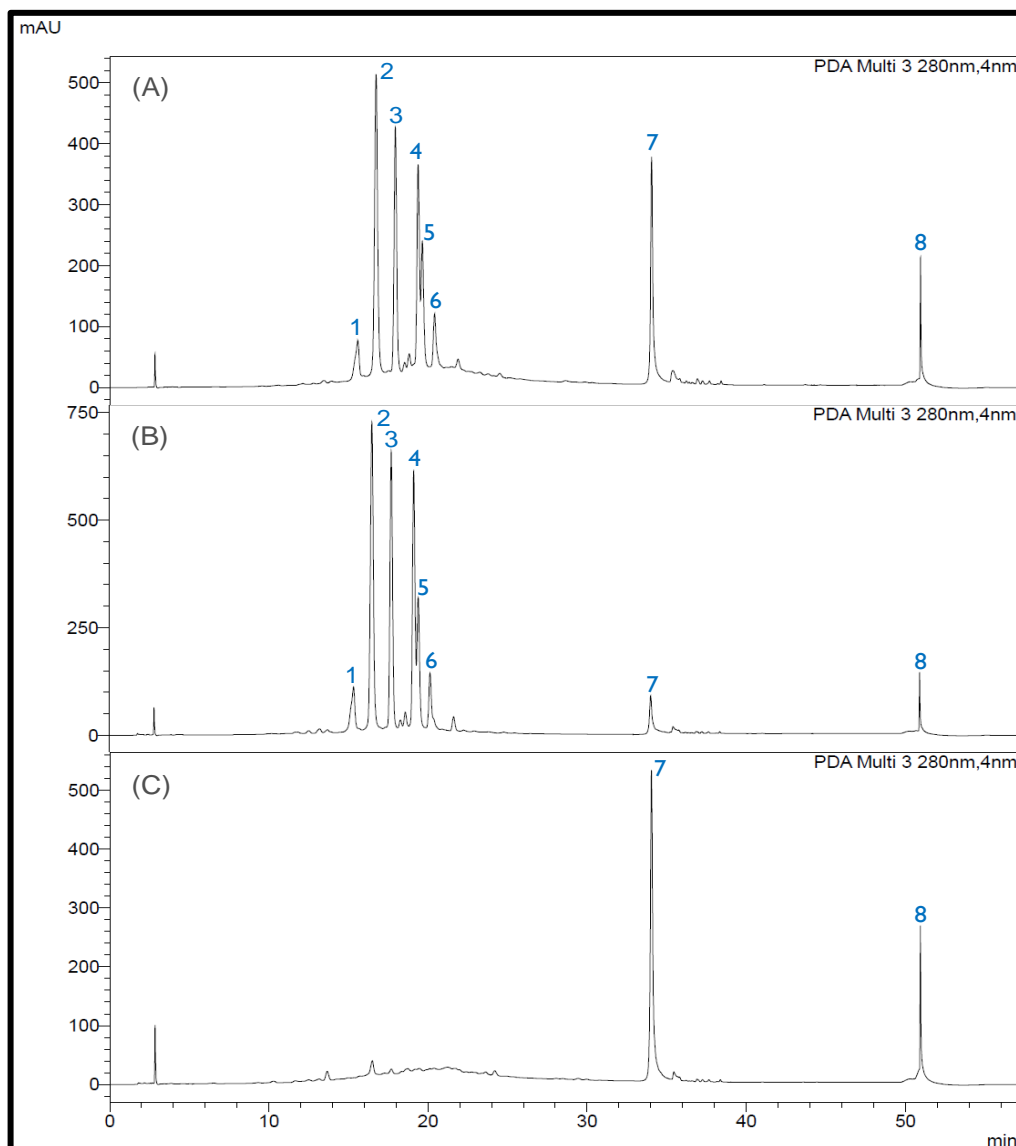


Figura 12: Cromatogramas (280 nm) de FEFCH (A), FFCH (B) e SCH (C) (CLAE-DAD).

Tabela 4: Dados da CLAE-DAD-ESI-MS/MS dos compostos 1-6 presentes em FFCH.

Pico	Compostos	Tempo de retenção (min)	λ_{max} (nm)	m/z value [M-H] ⁻	MS/MS fragmentos (m/z)
1	2''-O-glicosil-isoorientina	7.6	270; 349	609	309; 339; 357; 369; 411; 429; 489; 591
2	Isoorientina	7.9	269; 349	447	327; 357; 371; 411; 429
3	2''-O-glicosil-isovitexina	8.2	270; 338	593	293; 323; 413; 473
4	Rutina	8.6	255; 354	609	270; 301; 343
5	Isovitexina	8.7	269; 339	431	311; 341; 395; 413
6	Isoquercitrina	9.0	255; 353	463	301; 343; 463

Em nossos estudos anteriores com extratos de *Cecropia*, observamos uma adsorção irreversível de componentes vermelho-marrons na fase RP-2 após a eluição com gradiente água/etanol. A fim de maximizar o rendimento da separação cromatográfica, evitando a perda desses constituintes, substituímos a fase estacionária RP-2 por um gel de Sephadex G-25, um dextrano reticulado com uma rede tridimensional que incha em água e age como uma mídia cromatográfica. O gel Sephadex G-25 atuou como uma alternativa mais adequada e ainda mais verde ao RP-2, uma vez que a adsorção no gel foi menor e a eluição foi realizada essencialmente com água. Depois de recuperar os flavonoides 1-6 com água, alternamos a fase móvel para uma solução de etanol a 50% em água, liberando os restantes compostos 7-8. Os flavonoides 1-6 foram reunidos em conjunto na fração FFCCH, enquanto os compostos 7-8 constituíram fração SCH. Ao agrupá-los em apenas duas amostras, conseguimos racionalizar melhor nossos ensaios *in vivo*. Este processo de fracionamento está resumido na figura 13.

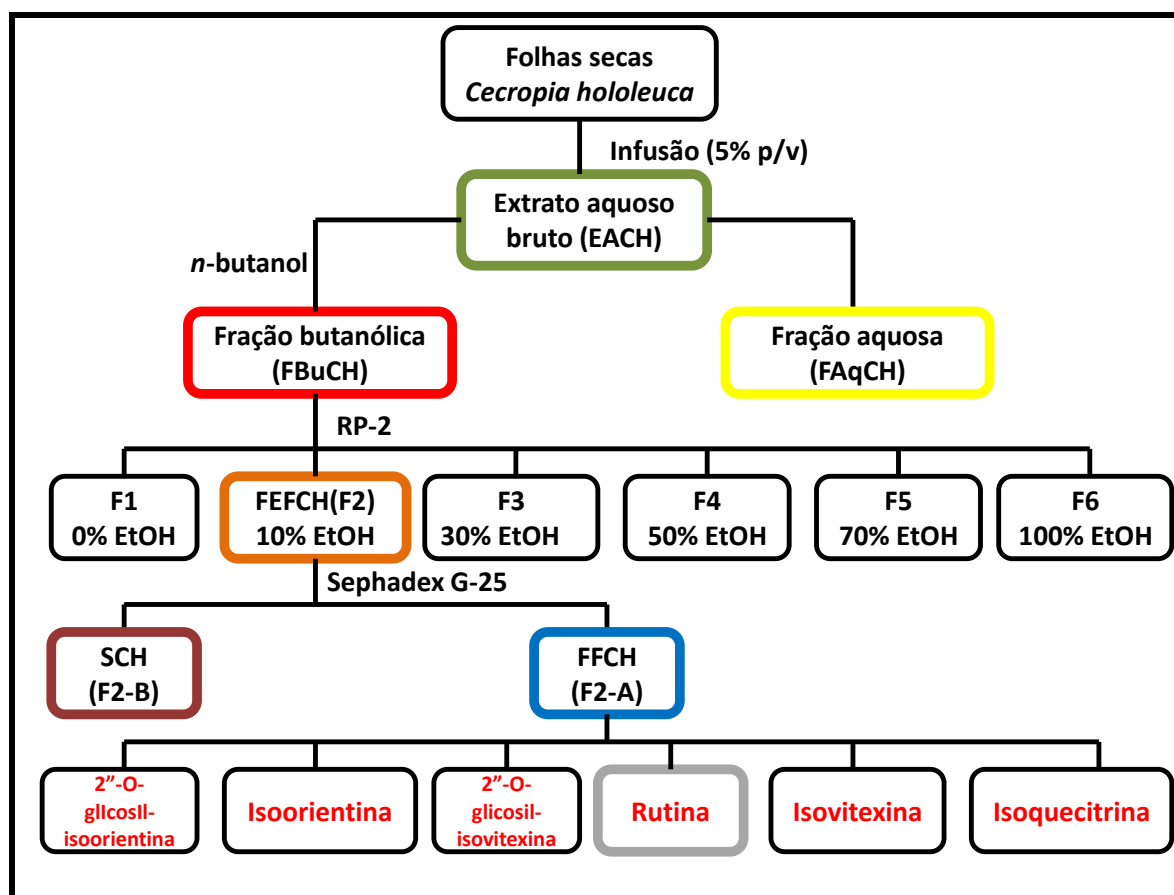


Figura 13: Fluxograma da extração e fracionamento das folhas de *Cecropia hololeuca*.

7.3 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 e 35 g, adultos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas (caixa de polipropileno de dimensões: 30 x 19 x 13 cm), em número máximo de 5 animais por gaiola. As gaiolas foram identificadas individualmente com etiquetas penduradas externamente, e mantidas em salas

climatizadas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) sob ciclo de claro/escuro (12/12 h), sendo as luzes ligadas às 06:00 h, e com regime de água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986; PORTER, 1992). Para a execução dos experimentos padronizou-se o período mínimo de uma hora para adaptação dos animais ao laboratório.

Após as avaliações experimentais os animais foram submetidos à eutanásia adequada ao ensaio farmacológico instituído, bem como atendendo às diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRRJ), comissão a qual este projeto foi submetido e aprovado (protocolo nº 012/2014).

7.4 Fármacos, reagentes e solventes

Os extratos, as frações e a rutina isolada de *C. hololeuca* foram fornecidos pela Prof^a Dr^a Sônia Soares Costa do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Dexametasona (Decadron[®], Aché Lab. Farm., São Paulo, Brasil), água destilada, solução salina 0,9%, ácido acético, indometacina, carragenina, zimosan e ácido clorogênico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), fentanil (Fentanest[®], Cristália, São Paulo - Brasil) diazepam (Laboratório União Quím. Farm. Nacional S.A. São Paulo, Brasil), ELISA kits para TNF- α (Duo set R&D systems[®], Minneapolis, MN), formaldeído 3,0%, éter, solução de PBS, heparina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), solução de Turk, violeta de genciana (ADV., São Paulo, Brasil).

7.5 Métodos de avaliação farmacológica

7.5.1 Determinação das doses conforme os rendimentos

Como descrito no tópico sobre a prospecção fitoquímica, o fracionamento da *Cecropia hololeuca* através de partições com solventes orgânicos permitiu o isolamento de uma fração flavonoídica e a identificação do flavonoides isolados (2''-O- glicosil-isorientina, 2''-O- glicosil-isovitexina, isovitexina, isorientina, isoquercetrina e rutina). Nos testes de avaliação da atividade farmacológica, as doses estipuladas para os ensaios biológicos das substâncias isoladas, consideraram os rendimentos de massa encontrados neste fracionamento a partir do extrato aquoso bruto e estão ilustrados na figura 14.

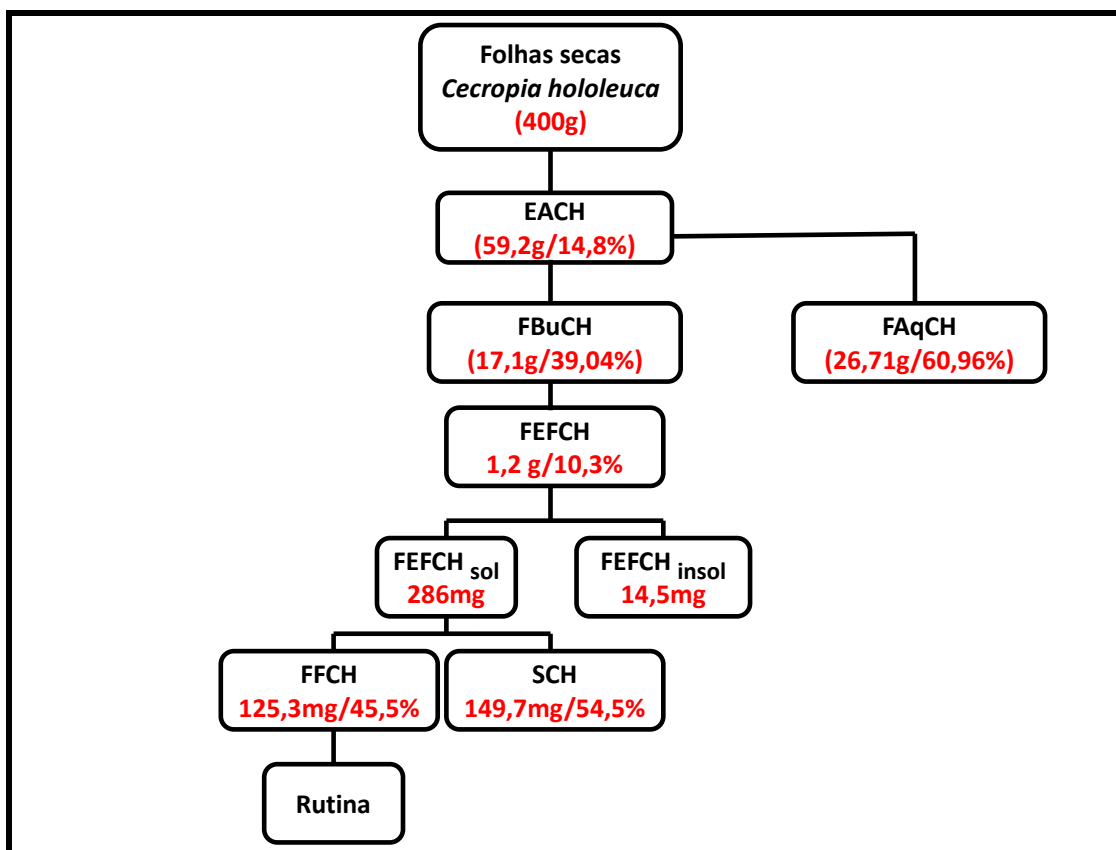


Figura 14: Fluxograma do fracionamento das folhas de *Cecropia hololeuca* destacando a quantidade de massa extraída, bem como seus respectivos rendimentos. Extrato Aquoso (EACH), fração butanólica (FBuCH), fração aquosa (FAqCH), fração enriquecida em flavonoides (FEFCH), fração flavonoidica (FFCH), composto livre de flavonoides (SCH).

7.5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

7.5.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Empregando a metodologia descrita por Koster e colaboradores (1959), grupos de 6 a 8 camundongos foram pré-tratados por via oral com o veículo (água), com quatro doses do extrato aquoso de *Cecropia hololeuca* (EACH 30, 100, 300 e 1000 mg/kg), com uma dose da fração butanólica (FBuCH 120 mg/kg), da fração aquosa (FAqCH 180mg/kg), considerando sempre os respectivos rendimentos ou com o controle positivo indometacina (INDO 10mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, foi injetado ácido acético diluído em salina (1,2%; 10ml/kg, *i.p.*) em todos os animais e as contorções abdominais, consideradas como contrações da parede abdominal seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores foram contadas por 30 minutos (VACHER et al., 1964). Para isso, os camundongos foram colocados individualmente sob funis de vidro, com um período de adaptação prévia de 15 minutos. Os resultados foram expressos como as médias \pm erro padrão das médias dos números de contorções acumuladas durante os 30 minutos de avaliação experimental, ou como percentagem de inibição das contorções comparativamente ao grupo controle, permitindo dessa forma, a determinação da dose inibitória 50% (DI50).

7.5.2.2 Teste de imersão da cauda

Neste teste, os camundongos foram individualmente contidos e o terço inferior da cauda foi imerso em água aquecida a 55°C. Foi realizada uma leitura controle 30 minutos antes, seguida de leituras 30, 60, 90 e 120 minutos após administração por via oral do veículo (água), do EACH (1g/kg) ou administração por via subcutânea de fentanil (50 µg/kg). Para evitar a lesão tecidual, foi estabelecido como período máximo de latência 20 segundos. Os resultados foram expressos como a média da latência(s) ± o erro padrão da média necessário para o reflexo de retirada da cauda, dentro dos tempos determinados (D'AMOUR & SMITH, 1941).

7.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

7.5.3.1 Teste da pleurisia induzida pela carragenina

Grupos experimentais de camundongos (n=10) foram pré-tratados por via oral com o veículo, com o EACH (100, 300 e 1000 mg/kg), com as frações FAqCh (60, 180 e 600 mg/kg), FBuCH (400mg/kg) e com a fração enriquecida em flavonoides (FEFCH 2,5, 5 e 10mg/kg) considerando sempre os respectivos rendimentos ou por via subcutânea com dexametasona (2 mg/kg), controle positivo do ensaio. A pleurisia foi induzida através da administração intra-torácica (*i.t.*) de 100 µL de carragenina (1% em salina estéril) uma hora após os tratamentos por via oral (veículo, extrato e frações) e 30 minutos após o tratamento com dexametasona. Decorridas 4 horas, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo então realizada o acesso e a lavagem da cavidade pleural com 1000 µL de solução de PBS heparinizado (20 UI/mL). Posteriormente, uma alíquota de 20 µL do lavado pleural de cada animal foi transferida para um Eppendorf® contendo 380 µL de líquido de Turk (diluição 1:20), possibilitando assim a coloração dos leucócitos e sua posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica (MALVAR et al., 2014). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média do número de leucócitos totais x 10⁶/mL.

7.5.3.2 Modelo de artrite induzida por zimosan

Na artrite induzida por zimosan, uma hora após tratar os animais por via oral (n=10) com o veículo, com o EACH (1g/kg), com a FAqCH (180 e 600 mg/kg), com a FBuCH (400mg/kg), com a FEFCH (2,5, 10, 50 e 100 mg/kg), com a SCH (55 mg/kg), com a FFCH (45mg/kg) ou com a rutina (30mg/kg) sempre considerando os respectivos rendimentos (Tabela 5) e, 30 minutos após a aplicação subcutânea (*s.c.*) do controle positivo dexametasona (DEXA 2mg/kg) foi realizada a anestesia inalatória com halotano 2% para a indução da artrite através da administração de 150µg de zimosan diluído em 10µL de salina na articulação fêmuro-tibio-patelar direita (*i.a.*) dos camundongos, utilizando uma agulha de 29G, inserida diretamente no espaço articular (PINTO et al., 2010).

A avaliação da formação de edema articular foi determinada através da medida do diâmetro transverso da articulação fêmuro-tibio-patelar, com o auxílio de um paquímetro digital antes e seis horas depois do estímulo *i.a.* Os resultados foram expressos como a diferença do diâmetro transverso da articulação aferido seis horas após a injeção *i.a.* subtraído do valor aferido antes do estímulo, e serão expressos em milímetros (mm).

A avaliação da hipernocicepção mecânica na articulação fêmuro-tibio-patelar foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico com auxílio de um analgesímetro digital modelo EFF 302 (Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão na pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm

de diâmetro adaptada a este. Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de 5 mm² de vazão (tipo tela) de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 5 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Abaixo destas caixas de experimentação, espelhos foram posicionados a 25 cm de distância para facilitar a visualização da região plantar dos animais. Foi aplicada uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal, por entre as malhas da rede, até que se observou uma resposta caracterizada como retirada da pata estimulada (CUNHA et al., 2004). Os estímulos foram repetidos por até seis vezes e a intensidade de hipernocicepção foi quantificada através da média de três valores similares, expressos em gramas, representando a latência de retirada da pata ao estímulo mecânico, em cada momento de avaliação. A avaliação do limiar nociceptivo mecânico é representado pela diferença entre os valores encontrados nos tempos zero e 6 horas após a administração intra-articular de zimosan.

Após o experimento, os animais foram eutanasiados para a determinação da migração de neutrófilos e a cavidade articular fêmuro-tíbio-patelar foi exposta para realização do lavado articular com PBS heparinizado (10 UI/mL). Ao lavado articular foi adicionado líquido de Turk (1:20) para contagem de leucócitos em câmara de Neubauer usando microscópio óptico em aumento de 400x (KEYSTONE et al., 1977) e os resultados da mensuração de leucócitos foram expressos como a média do número total de células na cavidade articular x 10⁴/mL (CONTE et al., 2010).

Tabela 5: Tratamentos e respectivas doses para o estudo dos compostos extraídos da *Cecropia hololeuca*, considerando seus respectivos rendimentos, no modelo de artrite induzida por zimosan.

ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN	Dose/Via de administração				
	Tratamentos	mg/kg, p.o.			mg/kg, s.c.
EACH				1000	
FAqCH			180	600	
FBuCH				400	
FEFCH	2,5	5	50	100	
SCH				45	
FFCH				55	
Rutina				30	
Dexametaxona					2

7.5.4 Avaliação da atividade motora -Teste do Rota-rod.

Para avaliar a ação do extrato aquoso de *Cecropia hololeuca* (EACH: 1g/Kg, p.o.) sobre a coordenação motora, grupos de oito camundongos foram colocados no rota-rod uma hora após o tratamento por via oral com o veículo, com o EACH (1g/kg) e 30 minutos após a aplicação intraperitoneal do controle positivo diazepam (5 mg/kg). Foi avaliado o tempo de permanência na barra giratória (12 rpm) durante 60 segundos, com tolerância de três quedas (DUHAM & MYIA, 1957).

7.6 Avaliação do mecanismo de ação.

7.6.1 Determinação da concentração articular de TNF- α .

Para determinação da concentração articular de TNF- α , os animais duas horas após a administração intra-articular de zimosan os animais foram tratados com veículo, EACH (1g/kg, *p.o.*), rutina (30 mg/kg, *p.o.*) ou dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) uma hora antes da administração de zimosan (10 μ L, 15 mg/kg) ou salina (10 μ L). Duas horas após a injeção de zimosan os animais foram eutanasiados para dissecação da articulação do joelho. (PINTO et al., 2010)

Os limites anatômicos proximal e distal para a dissecação da articulação fêmuro-tibio-patelar foram a epífise distal do fêmur e a epífise tibiofibular proximal, respectivamente. Após a dissecação, as articulações foram pesadas, maceradas em PBS (400 μ l) com homogeneizador elétrico e centrifugadas a 10.000 g, durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação da concentração articular de TNF- α por ELISA utilizando kits comerciais (R&D systems), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Os resultados, normalizados pelo peso de cada articulação, foram expressos como a média \pm erro padrão da média da concentração de TNF- α em picogramas por grama de tecido articular (CONTE et al., 2010).

7.7 Análise estatística

Em todos os métodos de avaliação farmacológica foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* para realização da análise estatística. Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós-testes Tukey ou Bonferroni. Foram admitidas diferenças significativas a partir de $p < 0,05$ (SOKAL & ROHLF, 1981).

8. RESULTADOS

8.1 Teste de atividade antinociceptiva

8.1.1 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Para avaliar a existência de uma possível atividade antinociceptiva do EACH foi escolhido o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2%; 10mL/kg, *i.p.*). Os resultados deste primeiro ensaio de triagem mostraram que a administração oral com diferentes doses de EACH promoveu uma redução dose-efeito no número de contorções abdominais encontrando valores significativos a partir da dose de 100 mg/kg (28,7±2,9 contorções abdominais e inibição de 35,9%) e maior percentual de inibição com a dose de 1000 mg/kg (15,9±4,3 contorções abdominais e inibição de 64,5%), de forma semelhante ao controle positivo indometacina (16,7±3,1 contorções abdominais e inibição de 62,7%) e fazendo um contraponto ao veículo (Figura 15 e tabela 6). A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pelo método das contorções abdominais permitiu o cálculo das doses inibitórias 50% (ID50) que foi igual a 190mg/kg (Figura 16).

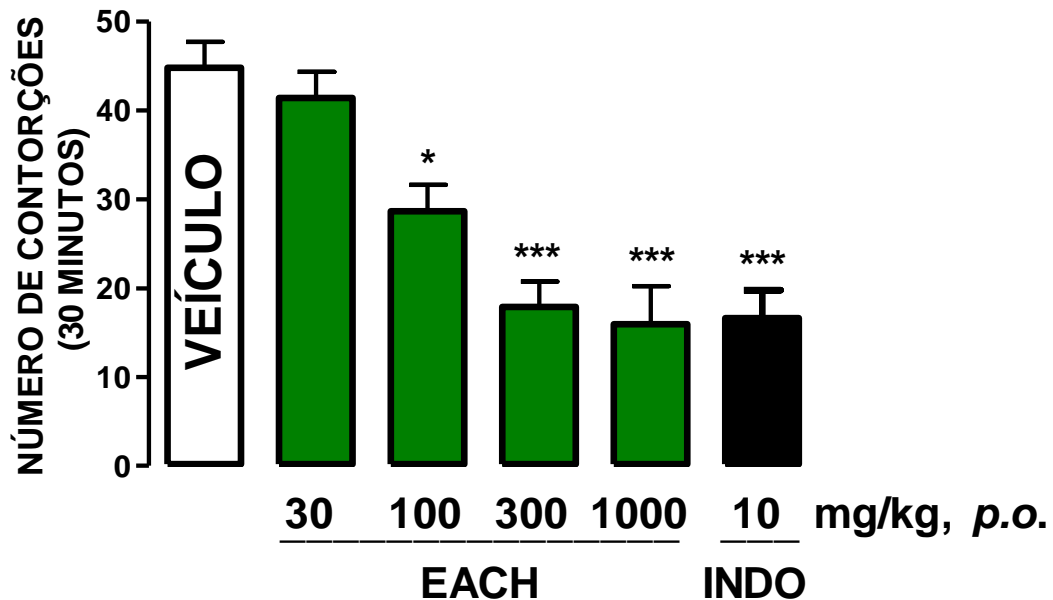


Figura 15 Efeito do pré-tratamento por via oral com o EACH (30, 100, 300 e 1000 mg/kg) ou com indometacina (10 mg/kg) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam as médias \pm erro padrão da média do número de contorções acumuladas em 30 minutos de 6 a 8 camundongos, por grupo experimental.

Tabela 6: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de contorções abdominais apresentados pelo EACH e INDO no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/Kg, *i.p.*). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para $n = 6$ a 8 animais.

CONTORÇÕES ABDOMINIAS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO	TRATAMENTOS					
	Veículo	EACH			INDO	
DOSE (mg/kg, p.o.)		30	100	300	1000	10
Número de contorções abdominais (30 minutos)	44,8 \pm 2,9	41,4 \pm 2,9	28,7 \pm 2,9 *	17,9 \pm 2,8 ***	15,9 \pm 4,3 ***	16,7 \pm 3,1 ***
% Inibição			35,9	60	64,5	62,7

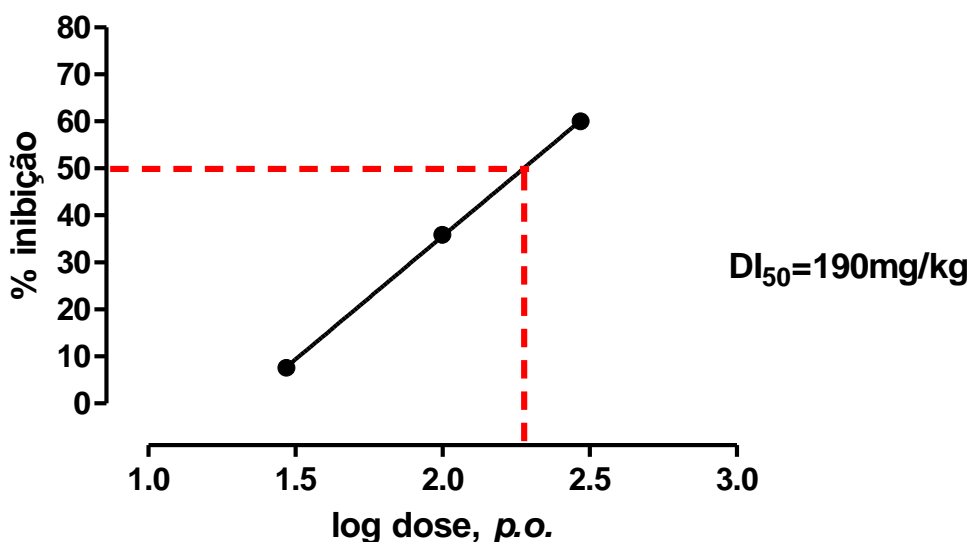


Figura 16: Porcentagem de inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/kg, *i.p.*) em camundongos previamente tratados (60 minutos) pela via oral com EACH (30, 100 e 300 mg/kg). Os símbolos e linhas verticais representam as médias \pm erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo experimental.

No mesmo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e em uma etapa à frente no fluxograma estudo desta espécie, foram testadas as frações aquosa (180mg/kg, *p.o.*) e butanólica (120mg/kg, *p.o.*) respeitando seus respectivos rendimentos. Observamos que estas frações foram capazes de reduzir significativamente o número de contorções abdominais, com percentuais de inibição de 80% e 37,9%, respectivamente, quando comparados ao veículo (44,8±2,9 contorções abdominais). De forma semelhante, o controle positivo indometacina apresentou percentual de inibição significativo de 58% (Figura 17 e tabela 7).

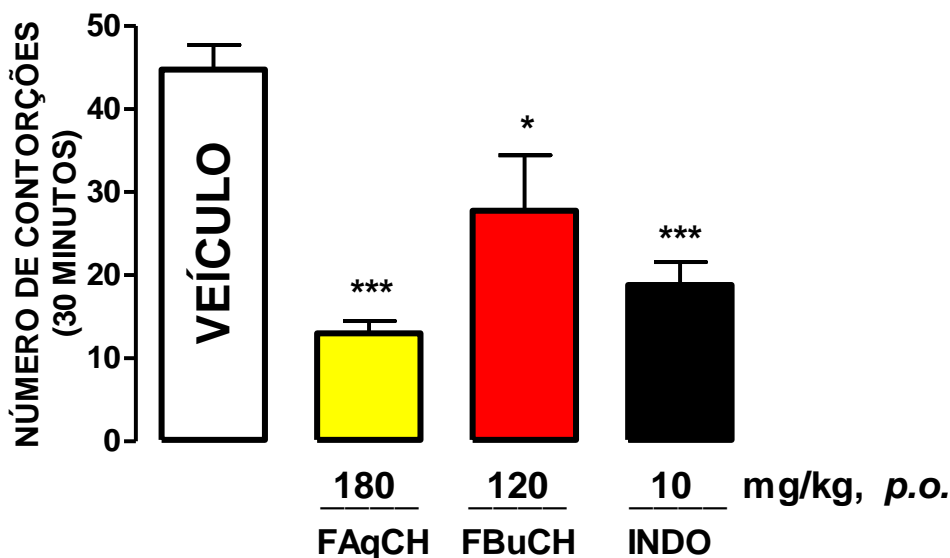


Figura 17. Efeito do pré-tratamento por via oral com o FAqCH (180 mg/kg), FBuCH (120 mg/kg) ou com indometacina (10 mg/kg) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam as médias ± erro padrão da média do número de contorções acumuladas em 30 minutos de 6 a 8 camundongos, por grupo experimental.

Tabela 7: Médias ± EPM e valores percentuais de inibição do número de contorções abdominais apresentados pela FAqCH, FBuCH e pela INDO no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2% em salina, 10 mL/Kg, *i.p.*). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para $n = 6$ a 8 animais.

CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELO ÁCIDO ACÉTICO	TRATAMENTOS			
	Veículo	FAqCH	FBuCH	INDO
DOSE (mg/kg, <i>p.o.</i>)		180	120	10
Número de contorções abdominais (30 min.)	44,8±2,9	13±1,5 ***	27,7±6,7 *	18,8±2,8 ***
% Inibição		80	37,9	58

8.1.2 Teste de imersão da cauda

No teste de imersão da cauda, o EACH (1g/kg, *p.o.*) não promoveu alterações na latência ao estímulo térmico nos diferentes tempos em relação ao veículo, diferente do o controle positivo fentanil (50µg/kg, *s.c.*) que elevou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo térmico, principalmente nos tempos 30` (18,7±1,3 s), 60` (14,2±2,8 s) e 90` (10,1±0,9 s) após o tratamento, indicando que a antinocicepção promovida pelo EACH não está relacionada a mecanismos antinociceptivos de ação central (Figura 18 e tabela 8).

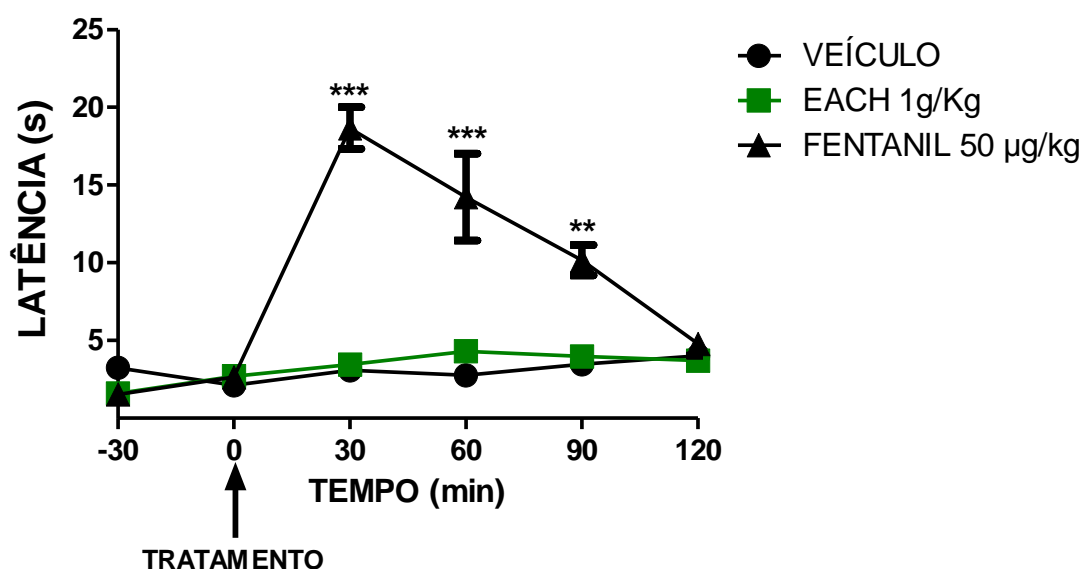


Figura 18: Efeito do EACH (1g/Kg, *p.o.*) e do Fentanil (50µg/kg, *s.c.*) sobre a latência em segundos induzida pela imersão da cauda em água quente (55°C±1°C) no teste de imersão da cauda. Os símbolos (● VEÍCULO, ▲ FENTANIL e ■ EACH) e barras verticais representam as médias ± erro padrão da média das variações da latência em segundos 8 camundongos por grupo experimental (***p*<0,01 e ****p*<0,001 significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).

Tabela 8: Médias ± EPM da latência em segundos apresentados pelo EACH e pelo fentanil no modelo de imersão da cauda em água quente (55°C±1°C).***p*< 0,01 e ****p*<0,001 para n = 8 animais.

TESTE DE IMERSÃO DA CAUDA	TRATAMENTOS/DOSE		
	Veículo	EACH (1g/kg, <i>p.o.</i>)	Fentanil (50µg/kg, <i>s.c.</i>)
Tempos de mesuração(min)	Latência (s)		
-30	3,2±0,4	1,5±0,08	1,5±0,04
0	2,1±0,2	2,6±0,5	2,6±0,5
30	3,1±0,4	3,4±0,5	18,7±1,3***
60	2,7±0,2	4,3±0,5	14,2±2,8***
90	3,5±0,2	3,9±0,6	10,1±0,9**
120	4,0±0,6	3,6±0,5	4,7±0,7

8.2 Avaliação da atividade motora -Teste do Rota-rod.

Considerando que os modelos utilizados na avaliação da antinocicepção são dependentes de respostas motoras dos animais, no teste do rota-rod o EACH (1g/kg, *p.o.*) não alterou o tempo de permanência no aparelho (60±0s) em relação ao veículo (59,75±0,25s) enquanto o grupo tratado com diazepam apresentou média de 24,63±7,3 segundos, indicando que o extrato aquoso não possui ação depressora do sistema nervoso central ou afeta a coordenação motora (Figura 19 e tabela 9).

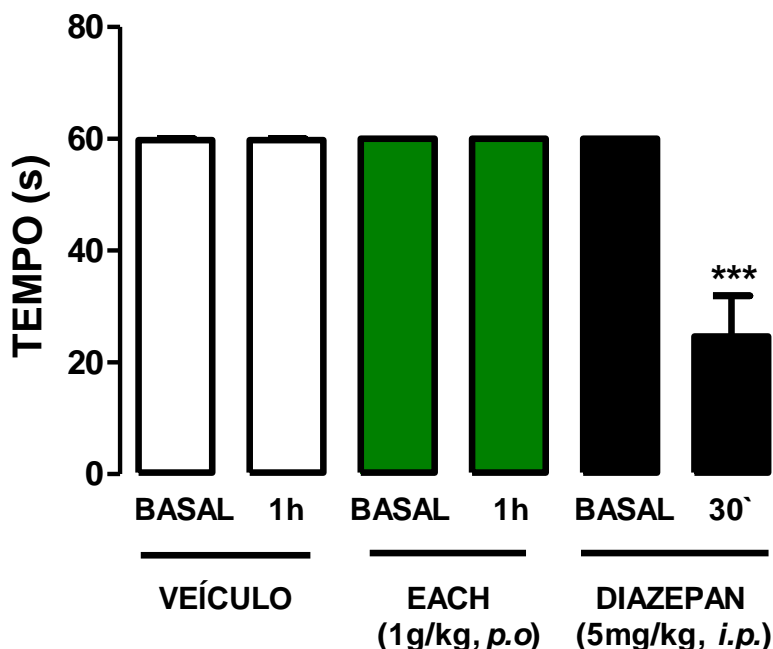


Figura 19: Efeito do extrato aquoso de *Cecropia hololeuca* (EACH: 1g/Kg, *p.o.*) e do diazepam (5 mg/kg, *i.p.*) no tempo de permanência dos camundongos na barra giratória (12 rpm/máximo de três quedas), no teste do rota-rod. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média \pm erro padrão da média (n=8).

Tabela 9: Médias \pm EPM do tempo de permanência na barra giratória (12 rpm) apresentados pelo EACH e pelo diazepam no teste do rota-rod. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo.

ROTA-ROD	TRATAMENTOS		
	Veículo	EACH (1g/kg, <i>p.o.</i>)	Diazepam (5 mg/kg, <i>i.p.</i>)
DOSE			
PARÂMETROS AVALIADOS			
Número de quedas	0	0	3
Tempo de permanência (s)	59,75±0,25 s	60±0 s	24,63±7,3 ***

8.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

8.3.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina

Para avaliar a atividade anti-inflamatória foi realizado o modelo da pleurisia induzida por carragenina., no qual a administração oral do extrato aquoso de *C. hololeuca*, nas mesmas doses utilizadas no teste de contorções induzidas pelo ácido acético (100, 300 e 1000 mg/kg) produziu somente na maior dose do EACH redução significativa do número de leucócitos que migraram para cavidade torácica ($1,6 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mL}$ leucócitos), alcançando um percentual de inibição de 50% quando comparados ao veículo. Essa característica efetividade anti-inflamatória obtida com o EACH foi semelhante à apresentada pelo controle positivo dexametasona, que inibiu 53,3% a migração de leucócitos (Figura 20 e tabela 10).

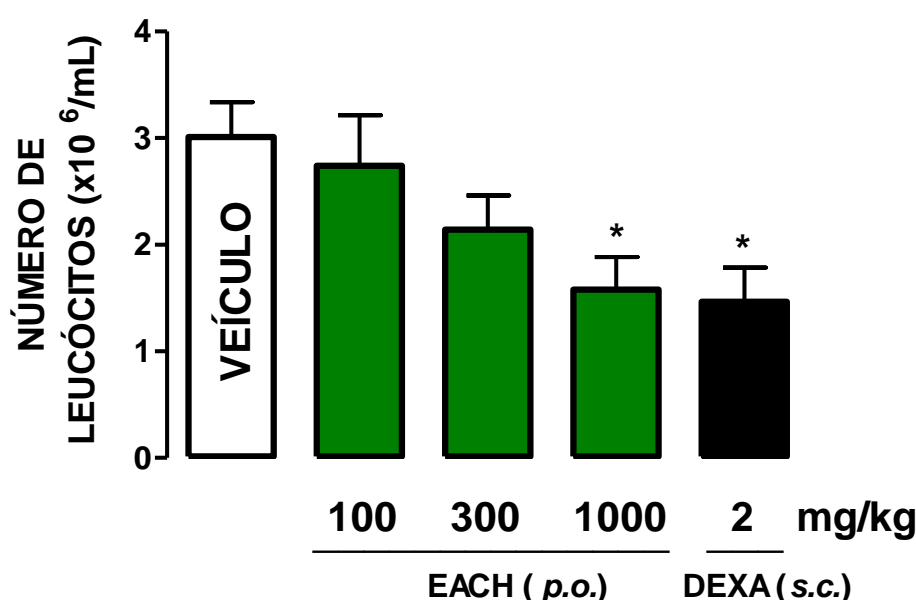


Figura 20: Efeito do EACH (100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. * $p < 0,05$, significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 8 camundongos.

Tabela 10: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pelo EACH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. * $p < 0,05$, para $n = 8$ animais.

PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	TRATAMENTOS				
	Veículo	EACH			DEXA (<i>s.c.</i>)
DOSE (mg/kg, <i>p.o.</i>)		100	300	1000	2
Número de leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	3,0 \pm 0,3	2,7 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3*	1,5 \pm 0,3*
% Inibição				50	53,3

Posteriormente foram avaliados as frações aquosa (FAqCH 60, 180 e 600 mg/kg, *p.o.*), butanólica (400mg/kg, *p.o.*) e a fração enriquecida em flavonoides (FEFCH) nas doses de 2,5, 5 e 10mg/kg administrados por via oral. A fração aquosa inibiu a migração de leucócitos de forma dose dependente, com valores significativos a partir da menor dose (60mg/kg) e com inibição máxima de 85,4% ($1,5 \pm 0,2 \times 10^6$ /mL leucócitos). Esta mesma efetividade foi observada na fração butanólica ($2,9 \pm 0,4 \times 10^6$ /mL leucócitos) e no controle positivo dexametasona ($2,6 \pm 0,4$) com inibições de 68,8% e 73,1%, respectivamente, em relação ao veículo ($9,6 \pm 0,9 \times 10^6$ /mL leucócitos) (Figura 21 e tabela 11).

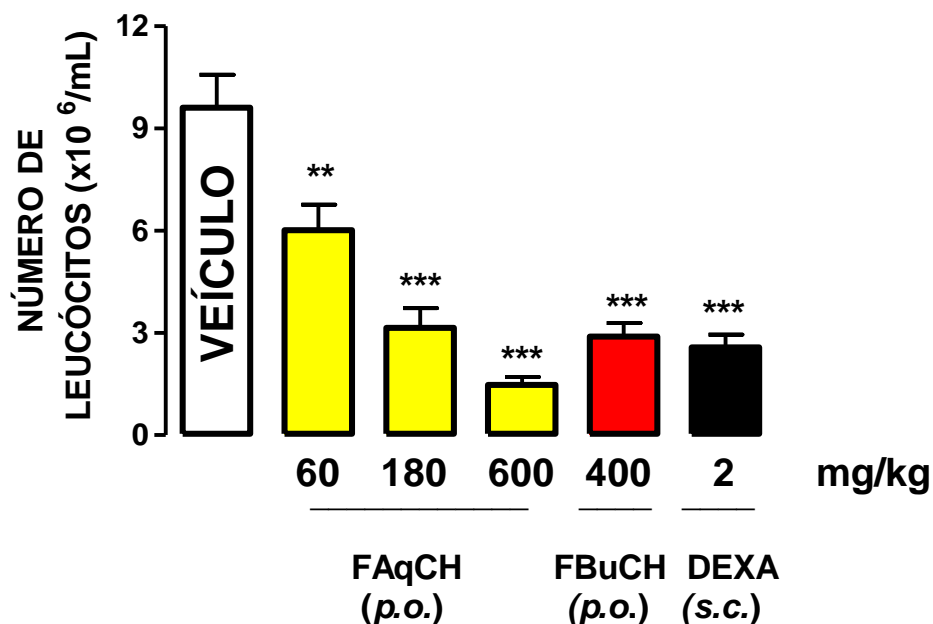


Figura 21. Efeito da FAqCH (60, 180 e 600 mg/kg, *p.o.*), da FBUCH (400mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ***p*<0,01 e ****p*<0,001, significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média ± E.P.M. de 8 camundongos.

Tabela 11: Médias ± EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pela FAqCH, FBUCH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** *p*< 0,01 e *** *p*<0,001, para n = 8 animais.

PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	TRATAMENTOS					
	Veículo	FAqCH			FBUCH	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, <i>p.o.</i>)		60	180	600	400	2
Número de leucócitos (x10 ⁶ /mL)	9,6±0,9	6,0±0,7 **	3,1±0,5 ***	1,5±0,2 ***	2,9±0,4 ***	2,6±0,4 ***
% Inibição		35,7	67,7	85,4	68,8	73,1

No teste com a fração enriquecida em flavonoides (FEFCH), todas as doses testadas (2,5, 5, e 10 mg/kg, *p.o.*) reduziram de forma semelhante a migração de leucócitos para cavidade pleural, com percentuais de inibição de 43,6%, 42,3% e 53,9%, respectivamente, quando comparados ao veículo ($7,8 \pm 1,3 \times 10^6$ /mL leucócitos), indicando que a efetividade anti-inflamatória máxima pode ser obtida com a menor dose da FEFCH. Neste ensaio, o controle positivo dexametasona que inibiu a migração de leucócitos em 76,9% ($1,8 \pm 0,3 \times 10^6$ /mL leucócitos) (Figura 22 e tabela 12).

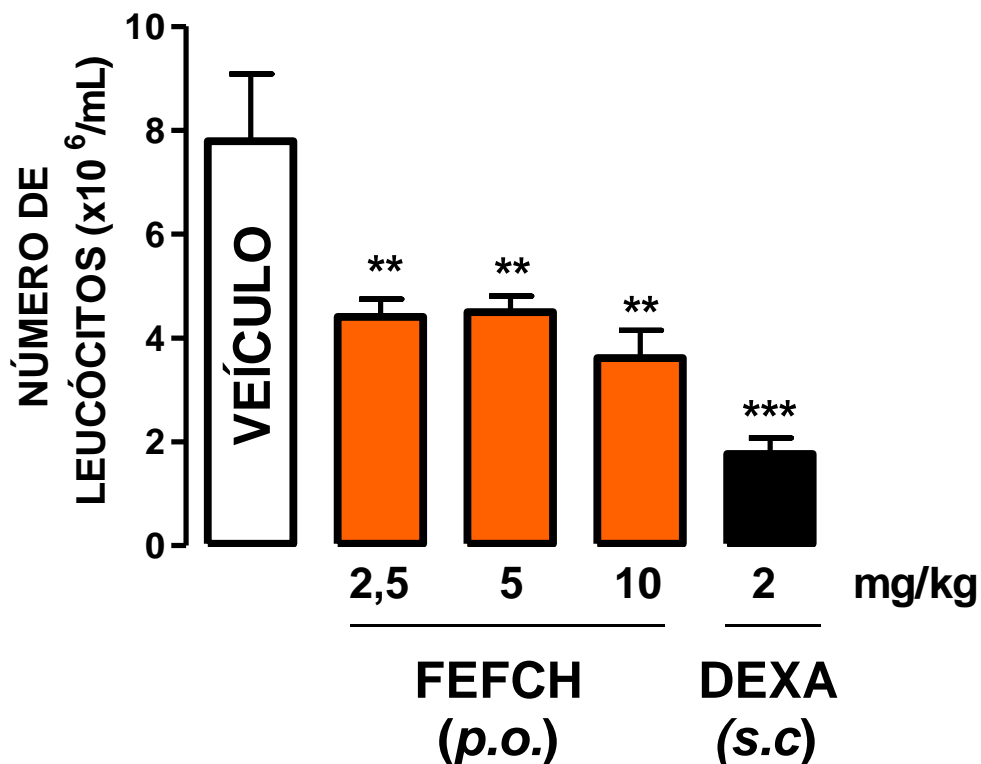


Figura 22: Influência do pré-tratamento com a FEFCH (2,5, 5 e 10 mg/kg, *p.o.*) e dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) no número de leucócitos que migraram para cavidade pleural (médias \pm erro padrão da média) induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 8$ animais.

Tabela 12: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição do número de leucócitos apresentados pela FEFCH e pela DEXA no modelo de pleurisia induzida pela aplicação intratorácica carragenina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 8$ animais.

PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	TRATAMENTOS				
	Veículo	FEFCH			DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, <i>p.o.</i>)		2,5	5	10	2
Número de leucócitos (x10 ⁶ /mL)	7,8 \pm 1,3	4,4 \pm 0,3 **	4,5 \pm 0,3 **	3,6 \pm 0,3 **	1,8 \pm 0,3 ***
% Inibição		43,6	42,3	53,9	76,9

8.3.2 Modelo da artrite induzida pelo zimosan

Primeiramente, a avaliação do EACH (1g/kg, *p.o.*) na artrite induzida por zimosan reduziu significativamente o limiar nociceptivo, a formação de edema e a migração de leucócitos para a cavidade articular com percentuais de inibições significativos em relação ao veículo, ocorrendo o mesmo com o controle positivo dexametasona (Figura 23 e tabela 13).

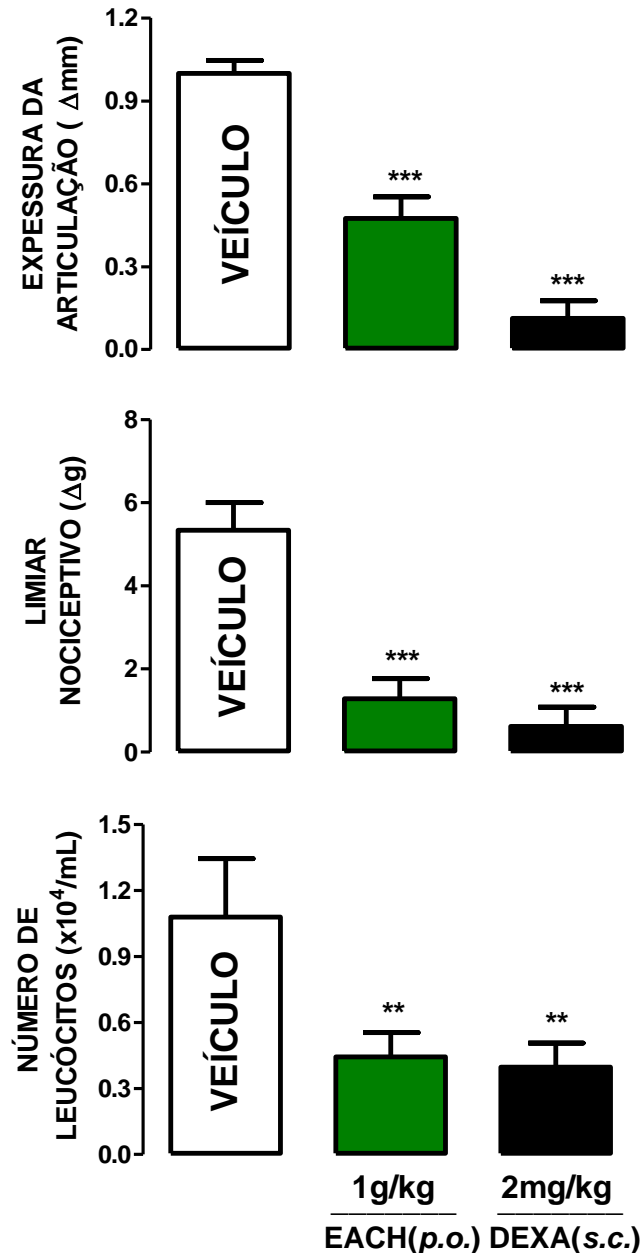


Figura 23. Efeito do EACH (1g/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e migração leucocitária ($10^4/\text{mL}$), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de $n=10$ (** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).

Tabela 13: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos ($10^4/\text{mL}$) apresentados pelo EACH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$, para $n = 10$ animais.

ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS		
		Veículo	EACH	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, p.o.)			1000	2
TESTES	PARÂMETROS AVALIADOS			
Edema articular	Espessura da articulação (Δmm)	$1,0 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,08$ ***	$0,1 \pm 0,06$ ***
	% Inibição		53	89
Von Frey	Limiar nociceptivo (Δg)	$5,3 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,5$ ***	$0,6 \pm 0,5$ ***
	% Inibição		76,1	88,6
Migração de leucócitos	Número de leucócitos ($\times 10^4/\text{mL}$)	$1,1 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$ **	$0,4 \pm 0,1$ **
	% Inibição		63,6	67,3

Posteriormente, no mesmo modelo foram testadas as frações aquosa (FAqCH, 180 e 600 mg/kg, p.o.) e butanólica (FBuCH, 400 mg/kg, p.o.). Na avaliação da atividade anti-edematogênica observamos que somente a maior dose da FAqCH e a FBuCH foram capazes de reduzir significativamente a variação na espessura da articulação, com percentuais de inibição de 50% ($0,5 \pm 0,1\text{mm}$) e 70% ($0,3 \pm 0,07\text{mm}$) quando comparados ao veículo ($1,0 \pm 0,1\text{mm}$). O controle positivo dexametasona apresentou média de $0,2 \pm 0,05\text{mm}$ e inibição de 80,6%.

Resposta semelhante foi observada no teste de Von Frey onde a redução significativa na variação do limiar nociceptivo foi promovida pelas frações aquosa (600mg/Kg) e butanólica (400mg/kg), e pelo controle positivo dexametasona, com médias de $4,3 \pm 0,2$ g (32,8%), $3,4 \pm 0,4$ g (47%) e $2,3 \pm 0,2$ g (64%), respectivamente, em relação ao veículo.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória os resultados obtidos mostraram que todas as doses administradas destas frações foram capazes de inibir significativamente a migração de leucócitos para cavidade articular, em relação ao veículo e semelhante à dexametasona. As FAqCH (180mg/Kg), FAqCH (600mg/Kg) e FBuCH (400mg/kg) apresentaram médias de $3,0 \pm 1,0 \times 10^4/\text{mL}$, $1,5 \pm 0,2 \times 10^4/\text{mL}$ e $1,6 \pm 0,6 \times 10^4/\text{mL}$ e inibições de 65,9%, 82,9% e 81,9%, respectivamente, em relação ao controle negativo ($8,8 \pm 1,0 \times 10^4/\text{mL}$). Da mesma forma, dexametasona inibiu 64,8% a migração leucocitária ($3,0 \pm 1,0 \times 10^4/\text{mL}$) (Figura 24 e tabela 14).

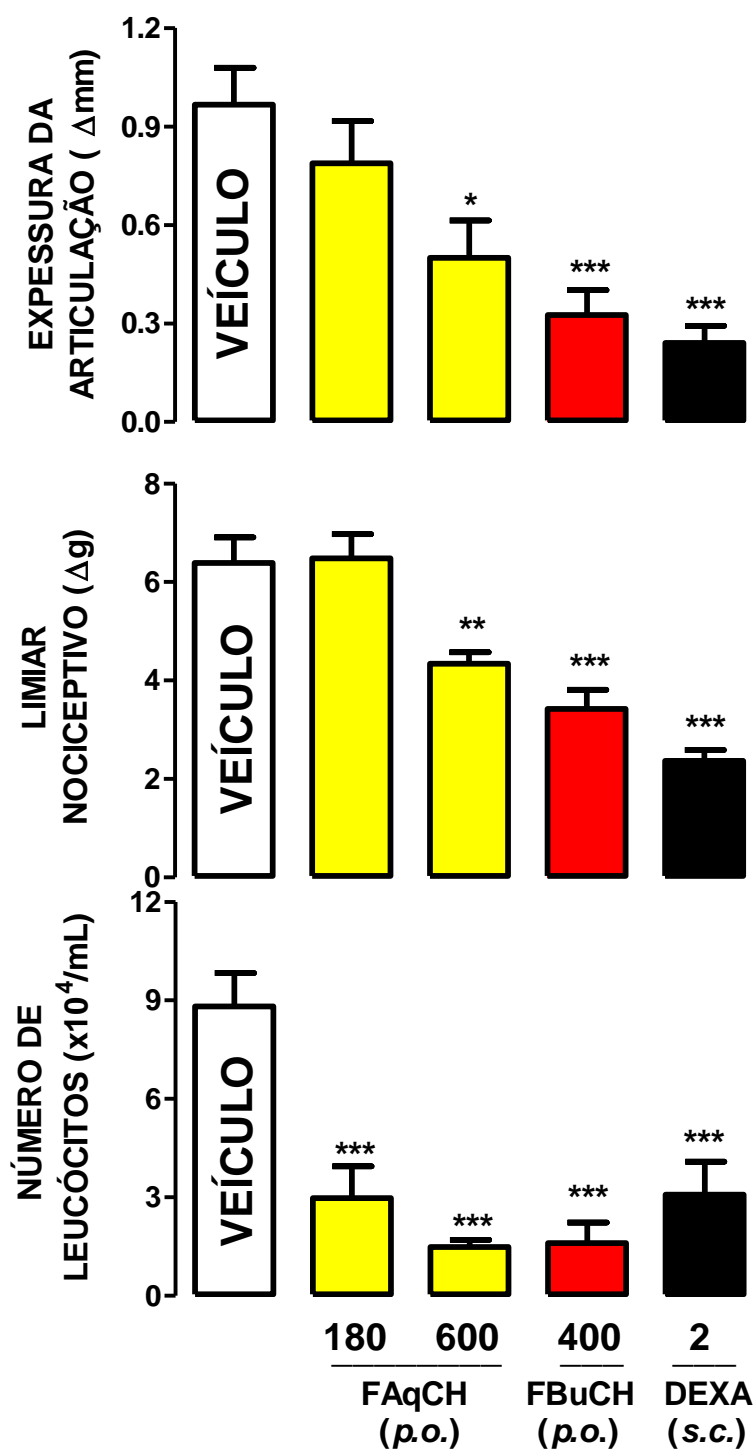


Figura 24. Efeito da FAqCH (180 e 600 mg/kg, *p.o.*), da FBUCH (400 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de $n=10$ (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).

Tabela 14: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos ($10^4/\text{mL}$) apresentados pela FAqCH, FBUCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.

MODELO DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS				
		Veículo	FAqCH		FBUCH	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, p.o.)			180	600	400	2
TESTES	PARÂMETROS AVALIADOS					
Edema articular	Espessura da articulação (Δmm)	1,0 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1 *	0,3 \pm 0,07 ***	0,2 \pm 0,05 ***
	% Inibição			50	70	80
Von Frey	Limiar nociceptivo (Δg)	6,4 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5	4,3 \pm 0,2 **	3,4 \pm 0,4 ***	2,4 \pm 0,2 ***
	% Inibição			32,8	47	64
Migração de leucócitos	Número de leucócitos ($\times 10^4\text{mL}$)	8,8 \pm 1,0	3,0 \pm 1,0 ***	1,5 \pm 0,2 ***	1,6 \pm 0,6 ***	3,1 \pm 1,0 ***
	% Inibição		65,9	82,9	81,9	64,8

Na investigação da atividade da fração enriquecida em flavonoides (FEFCH) nas doses de 2,5, 10, 50 e 100 mg/Kg, p.o., esta produziu reduções significativas da formação do edema, na variação do limiar nociceptivo e na migração de leucócitos após a aplicação intra-articular de zimosan, quando comparados aos seus respectivos veículos.

Na atividade anti-edematogênica, avaliada através da variação da espessura articular, apresentou percentual de inibição máximo de 47,4%, enquanto que o controle positivo dexametasona inibiu em 82,9% a formação do edema, comparativamente ao veículo (1,8 \pm 0,1mm).

No teste de Von Frey verificou-se a redução significativa no limiar nociceptivo apenas nas doses de 50 mg/kg (2,2 \pm 0,6g) e 100mg/kg (2,5 \pm 0,3g), com percentuais de inibição de 66,2% e 61,7%, respectivamente, quando comparados ao veículo (6,6 \pm 0,6g), com o controle positivo produzindo inibição de 74,2%. Em conta-partida, na avaliação da atividade anti-inflamatória, todas as doses apresentaram inibição significativa na migração de leucócitos e, apesar da efetividade observada, as diferentes doses da FEFCH testadas não apresentaram um comportamento dose-efeito, sugerindo que a resposta máxima pode ser obtida com dose de 2,5mg/kg (Figura 25 e tabela 15).

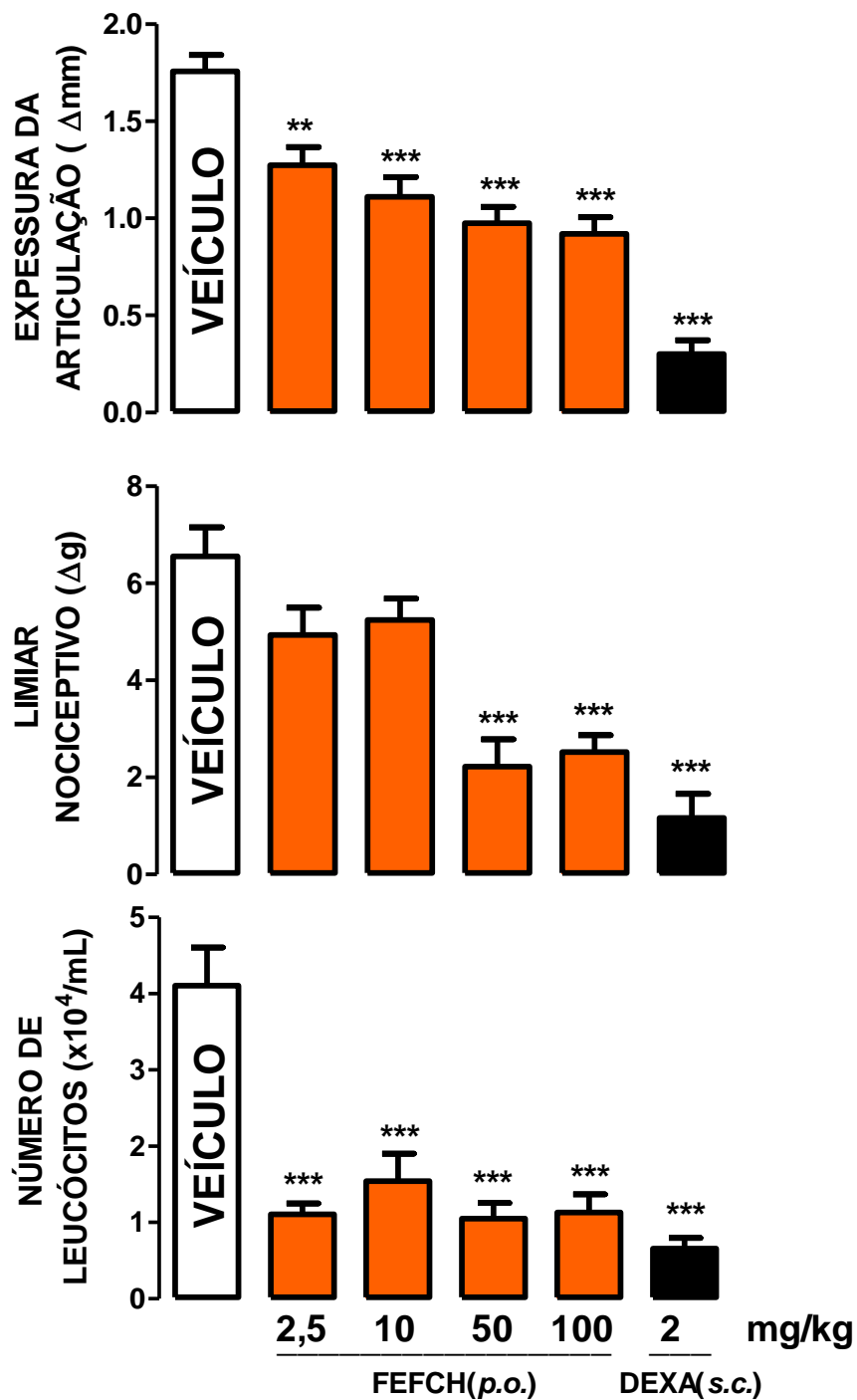


Figura 25. Efeito da FEFCH (2,5, 10, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária ($10^4/\text{mL}$), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de $n=10$ (***) $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo tratado com veículo).

Tabela 15: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos ($10^4/\text{mL}$) apresentados pela FEFCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.

MODELO DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS					
		Veículo	FEFCH				DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, p.o.)			2,5	10	50	100	2
TESTES	Parâmetros Avaliados						
Edema articular	Espessura da articulação (Δmm)	1,8 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1 **	1,1 \pm 0,1 ***	1,0 \pm 0,1 ***	0,9 \pm 0,1 ***	0,3 \pm 0,1 ***
	% Inibição		27,4	36,6	44,6	47,4	82,9
Von Frey	Limiar nociceptivo (Δg)	6,6 \pm 0,6	4,9 \pm 0,6	5,2 \pm 0,4	2,2 \pm 0,6 ***	2,5 \pm 0,3 ***	1,2 \pm 0,5 ***
	% Inibição				66,2	61,2	74,2
Migração de leucócitos	Número de leucócitos ($\times 10^4\text{mL}$)	4,1 \pm 0,5	1,1 \pm 0,1 ***	1,5 \pm 0,3 ***	1,0 \pm 0,2 ***	1,1 \pm 0,2 ***	0,7 \pm 0,1 ***
	% Inibição		73,2	62,4	74,3	72,4	84,1

Com o objetivo de isolar uma fração flavonoidica, novos ensaios fitoquímicos foram realizados no IPPN-UFRJ com a fração enriquecida em flavonoides (FEFCH), originando com o seu fracionamento duas novas amostras, uma livre de compostos fenólicos (SCH) e uma fração flavonoídica (FFCH). De acordo com seus respectivos rendimentos foram estipuladas as doses de 55 e 45mg/kg, respectivamente, para serem administrados por via oral, nos testes de atividade biológica.

No modelo da artrite induzida por zimosan, a FFCH (45mg/kg, p.o.) mostrou-se efetiva, inibindo significativamente a formação do edema, a nocicepção e a migração de leucócitos para a cavidade articular, quando comparados ao veículo, com percentuais de inibição de 43,5%, 55,9% e 83,3%, respectivamente, e de forma semelhante ao controle positivo dexametasona. Na amostra SCH não foram observados resultados significativos para as atividades testadas neste modelo (Figura 26 e tabela 16).

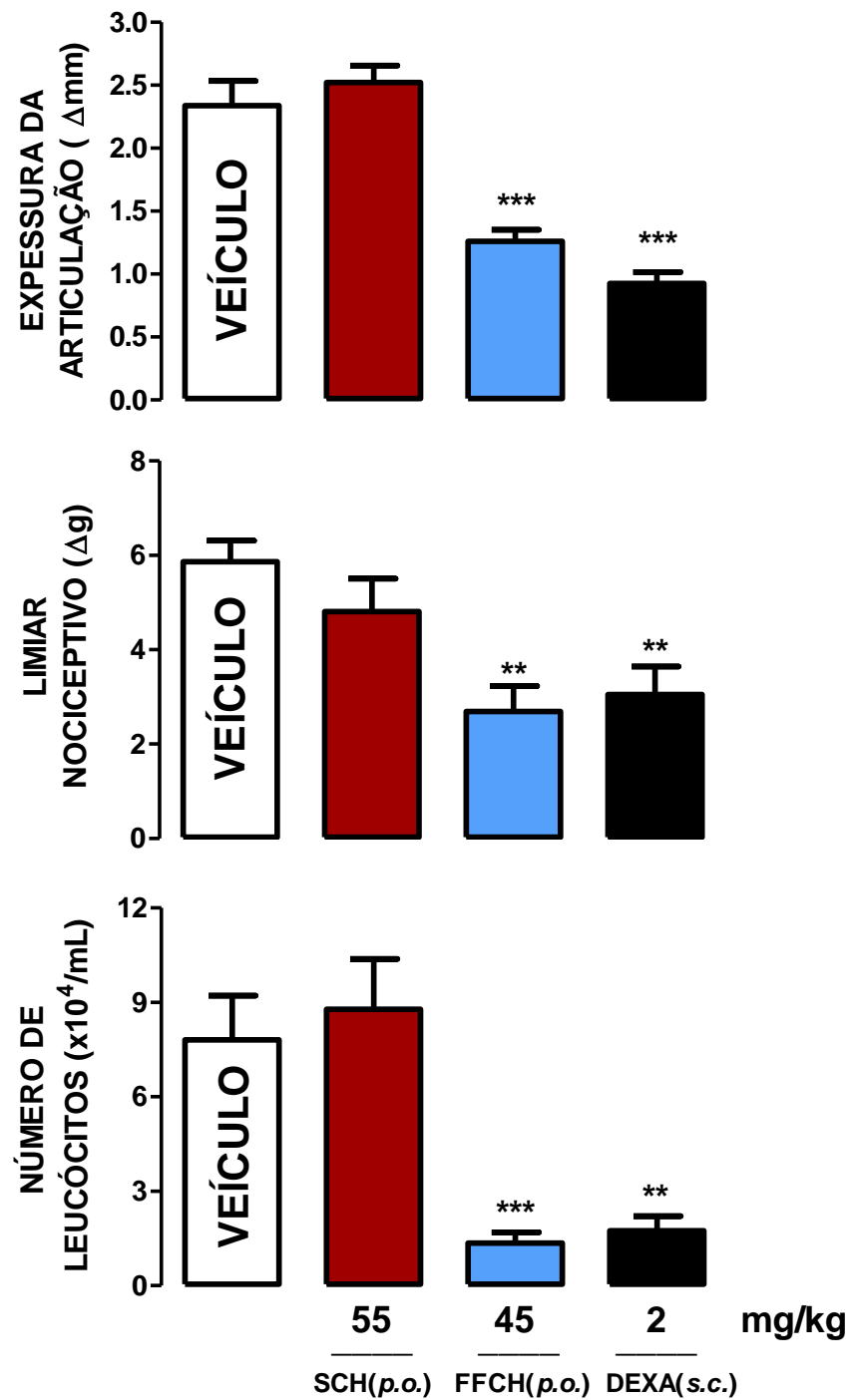


Figura 26: Efeito da SCH (55mg/kg, *p.o.*) e da FFCH (45 mg/kg, *p.o.*) e da dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária (10^4 /mL), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão de média de $n=10$ (** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).

Tabela 16: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentadas pela SCH, FFCH e pela DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais.

MODELO DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS			
		Veículo	SCH	FFCH	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, p.o.)			55	45	2
TESTES	PARÂMETROS AVALIADOS				
Edema articular	Espessura da articulação (Δmm)	2,3 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,09 ***	0,9 \pm 0,08 ***
	% Inibição			43,5	60,8
Von Frey	Limiar nociceptivo (Δg)	5,9 \pm 0,4	4,8 \pm 0,7	2,7 \pm 0,5 **	3,1 \pm 0,6 **
	% Inibição			55,9	49,2
Migração de leucócitos	Número de leucócitos ($\times 10^4$)	7,8 \pm 1,4	8,8 \pm 1,6	1,4 \pm 0,3 ***	1,7 \pm 0,5 **
	% Inibição			83,3	78,2

Com base em relatos da literatura, uma vez que não houve material suficiente para calcular o rendimento dos flavonoides isolados estipulamos a dose de 30 mg/kg para testar a atividade biológica da rutina (MARIANO, 2017).

A administração da rutina (30 mg/kg, *p.o.*) produziu antinocicepção através da efetiva redução da reatividade promovida pelo zimosan no teste de Von Frey, diminuiu o diâmetro da articulação fêmur-tibial se evidenciando atividade anti-edematogênica, bem como inibiu a migração de leucócitos para a cavidade articular, indicando a presença de propriedades anti-inflamatórias neste composto, com percentuais de inibições significativos em relação ao veículo e sendo observado o mesmo com o controle positivo dexametasona (Figura 27 e tabela 17).

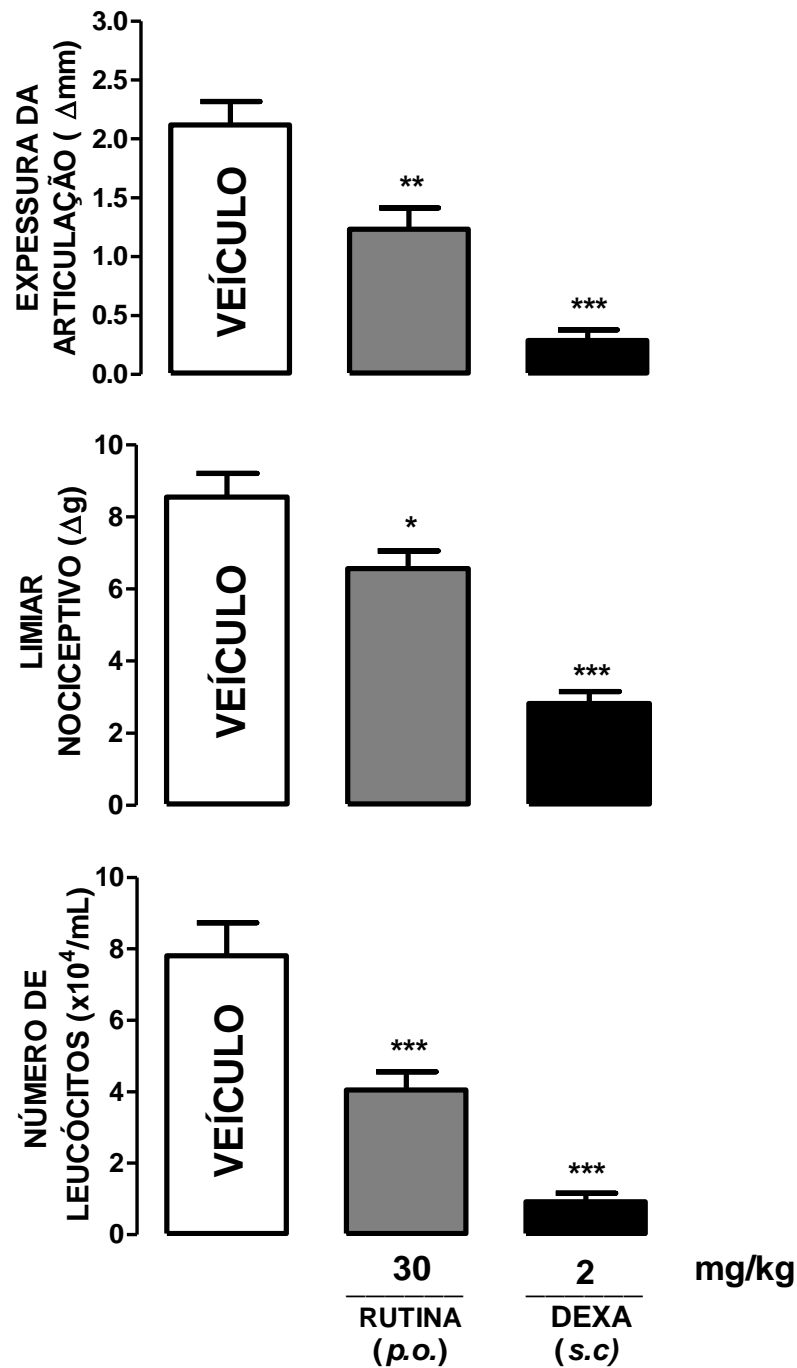


Figura 27: Efeito da Rutina (30 mg/kg, *p.o.*) sobre a variação da espessura da articulação (mm), variação do limiar nociceptivo (g) e da migração leucocitária (x10⁴/ml), induzida pela administração de zimosan intra-articular em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias ± erro padrão da média de n=10 (*p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001 significativamente diferentes do grupo tratado com veículo).

Tabela 17: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm), da variação do limiar nociceptivo (g) e do número de leucócitos (10^4 /mL) apresentados pela rotina e DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, para $n = 10$ animais).

MODELO DA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS		
		Veículo	Rutina	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg, p.o.)			30	2
TESTES	PARÂMETROS AVALIADOS			
Edema articular	Espessura da articulação (Δmm)	2,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2 **	0,3 \pm 0,1 ***
	% Inibição		42,9	85,7
Von Frey	Limiar nociceptivo (Δg)	8,6 \pm 0,6	6,5 \pm 0,4 *	2,8 \pm 0,3 ***
	% Inibição		24,4	67,4
Migração de leucócitos	Número de leucócitos ($\times 10^4$)	7,8 \pm 0,9	4,0 \pm 0,5 ***	0,9 \pm 0,2 ***
	% Inibição		48,7	88,4

8.4 Avaliação do mecanismo de ação

8.4.1 Determinação da concentração articular de TNF- α .

A administração intra-articular de zimosan induziu um aumento significativo da espessura articular ($1,1 \pm 0,08$ mm) e da concentração articular de TNF- α ($146,5 \pm 21,5$ pg/g de tecido) quando comparado ao grupo salina ($0,3 \pm 0,06$ mm e $61,4 \pm 9,3$ pg/g de tecido, respectivamente).

O pré-tratamento por via oral com o EACH (1000 mg/kg), com a rutina (30 mg/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) produziu uma redução significativa no edema articular duas horas após a aplicação intra-articular de zimosan, apresentando percentuais de inibição de 57,1% ($0,5 \pm 0,07$ mm), 40% ($0,6 \pm 0,1$ mm) e 62,9% ($0,4 \pm 0,1$ mm), respectivamente, quando comparados ao veículo. Adicionalmente os animais tratados com EACH e rutina inibiram o aumento de TNF- α articular induzida pelo zimosan em 36,2% ($93,4 \pm 17,4$ pg/g) e 43,5% ($82,8 \pm 5,3$ pg/g), respectivamente. Da mesma forma, o controle positivo dexametasona reduziu a concentração articular de TNF- α em 76,4 \pm 3,3 (47,8%) (Figura 28 e tabela 18).

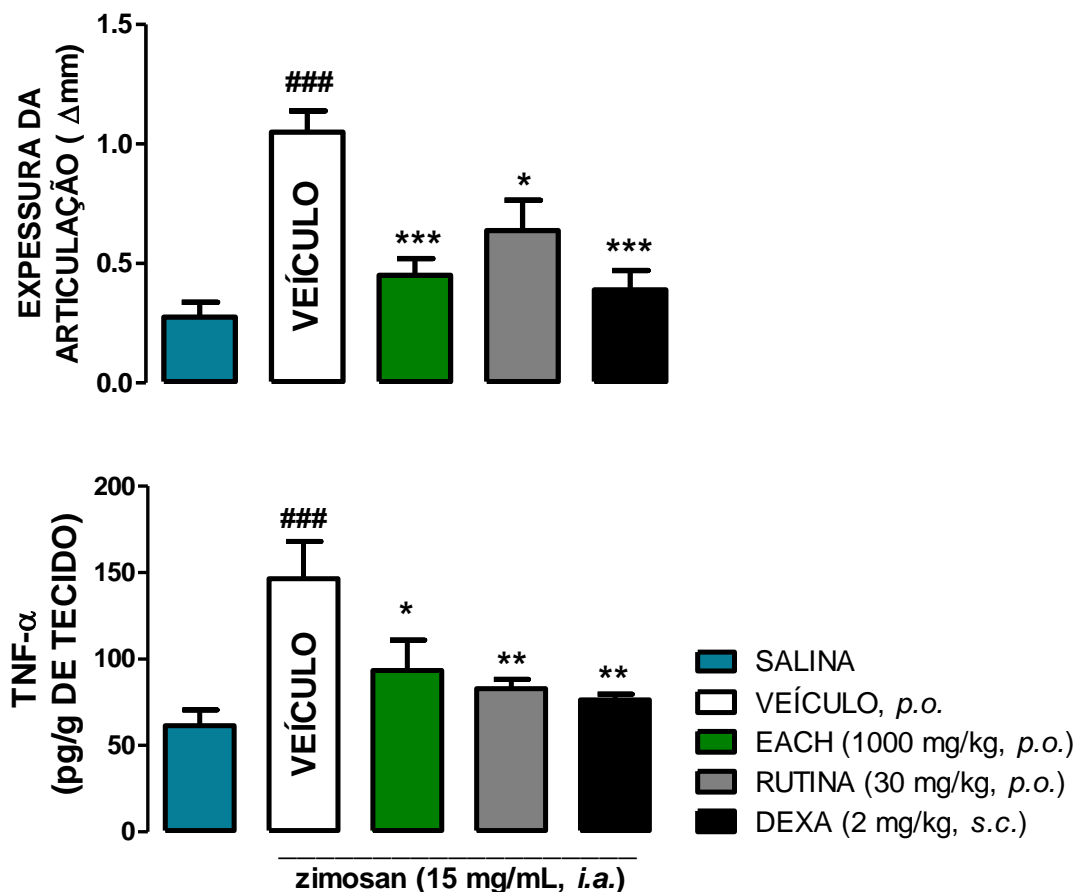


Figura 28: Efeito do EACH (1000 mg/kg, *p.o.*) e da rutina (30 mg/kg, *p.o.*) sobre a variação da espessura (mm) e a concentração de TNF- α (pg/g) articular induzida por zimosan em camundongos. As colunas e barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de $n=8-9$. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo.

Tabela 18: Médias \pm EPM e valores percentuais de inibição da variação da espessura da articulação (mm) e da concentração de TNF- α (pg/g) apresentados pelo EACH, rutina e DEXA no modelo de artrite induzida por zimosan. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo salina e * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo veículo, para $n = 8$ a 9 animais.

MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN		TRATAMENTOS				
		Salina	Veículo (p.o.)	EACH (p.o.)	Rutina (p.o.)	DEXA (s.c.)
DOSE (mg/kg)				1000	30	2
Testes	Parâmetros Avaliados					
Edema articular	Espessura da articulação (Δ mm)	0,3 \pm 0,06	1,1 \pm 0,08 ###	0,5 \pm 0,07 ***	0,6 \pm 0,1*	0,4 \pm 0,1 ***
	% Inibição			57,1	40	62,9
TNF- α	Concentração (pg/g de tecido)	61,4 \pm 9,3	146,5 \pm 21,5 ###	93,4 \pm 0,2 *	3,4 \pm 0,4 **	2,4 \pm 0,2 **
	% Inibição			32,8	47	64

9. DISCUSSÃO

A pesquisa de propriedades farmacológicas de produtos naturais, bem como o melhoramento dos métodos de triagem farmacológica, tem permitido a descoberta de substâncias farmacologicamente ativas, com importantes aplicações tanto na área experimental como na identificação de princípios ativos de interesse terapêutico (PERAZA et al., 2007).

Neste contexto, o método de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético tem particular interesse na investigação de substâncias com potencial analgésico de natureza central ou periférica. Apresenta-se como um modelo de dor visceral com característica marcante de baixa especificidade, uma vez que as contorções abdominais podem ser suprimidas por diversos mecanismos de ação antinociceptiva, bem como por agentes não analgésicos, como agentes miorrelaxantes (COUTO et al., 2011). É considerado um método de avaliação geral e não seletivo tendo em vista que a irritação local produzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicinina, prostaglandinas, principalmente PGE₂ e PGI₂, e as citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (PINHEIRO et al., 2011).

Desta forma, por ser frequentemente utilizado como um modelo de triagem para compostos potencialmente antinociceptivos, o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi utilizado para iniciar a investigação da atividade antinociceptiva do extrato aquoso da *Cecropia hololeuca*.

Inicialmente, para os testes com o EACH no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foram estabelecidas as doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o.* Como esperado, de acordo com os relatos etnobotânicos de atividade anti-inflamatória para as espécies do gênero *Cecropia*, os resultados mostraram que o EACH foi capaz de produzir uma redução dose-dependente no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo significativo nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg e permitindo o cálculo da dose inibitória 50% (DI50) que foi igual a 190 mg/kg. O efeito antinociceptivo dose-dependente do EACH sugere a especificidade farmacológica do extrato para atividade antinociceptiva.

Posteriormente, no mesmo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foram testadas as frações butanólica (FBuCH) e aquosa (FAqCH) nas doses de 120 mg/kg, *p.o.* e 180 mg/kg, *p.o.*, respectivamente. Estas doses foram estipuladas considerando seus respectivos rendimentos e a dose de 300 mg/kg, pois esta dose produziu percentual de inibição máximo nos testes com o EACH. O fracionamento do EACH rendeu aproximadamente 40% da FBuCH e 60% da FAqCH (Figura 30 - fluxograma). A partição do EACH em *n*-butanol objetivou formar uma fração orgânica rica em compostos fenólicos (FBuCH) com a atividade antinociceptiva semelhante à observada no extrato de origem, o que foi comprovado pela redução significativa no número de contorções abdominais e percentual de inibição de 37,9%. Contudo a fração aquosa residual (FAqCH 180 mg/kg, *p.o.*), também produziu efeito antinociceptivo significativo. Este resultado sugere que a FAqCH também possua substâncias biologicamente ativa com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória comprovada, no entanto, novos ensaios farmacológicos e fitoquímicos seriam necessários para comprovar essa hipótese e identificar possíveis compostos ativos.

Resposta semelhante foi produzida pelo controle positivo indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal inibidor não seletivo da enzima cicloxigenase, uma importante enzima envolvida na síntese de PGE₂, mediador responsável pela sensibilização de nociceptores e indução da hiperalgesia inflamatória (BRUNTON et al., 2012).

Após evidenciar a redução do comportamento nociceptivo através do modelo de contorções abdominais, a efetividade antinociceptiva do EACH foi confirmada através da

avaliação da capacidade motora dos animais utilizando o teste do rota-rod. O emprego desse modelo é uma prática comum nos testes farmacológicos para identificação de compostos com propriedades antinociceptivas, uma vez que estes testes são baseados em respostas comportamentais que dependem de atividade motora. Dessa forma, drogas que reduzam a atividade motora podem reduzir o comportamento nociceptivo sem produzir efeito antinociceptivo (PINTO et al., 2012).

No teste do rota-rod, o pré-tratamento dos animais EACH (1 g/kg, *p.o.*) não modificou o número de quedas e nem o tempo de permanência dos camundongos no rota-rod, fazendo um contraponto ao controle positivo diazepam (5 mg/kg, *i.p.*). Esse resultado exclui efeitos depressores sobre o sistema motor e/ou sistema nervoso central, reforçando os dados que sugerem o efeito antinociceptivo do EACH.

O teste de imersão da cauda permite avaliar atividade de substâncias presentes em extratos vegetais ou isolados a partir deles e de compostos sintéticos, cujos mecanismos antinociceptivos assemelham-se aos promovidos pelos analgésicos opioides. O aumento do tempo de reação é considerado como um importante parâmetro sugestivo de atividade antinociceptiva central, caracterizado por nocicepção aguda não-inflamatória (SILVA et al., 2013). Em nossos experimentos a administração de EACH (1 g/kg, *p.o.*) não alterou o tempo de latência ao estímulo térmico representada pelo movimento de retirada da cauda, diferente do controle positivo fentanil que aumentou a latência ao estímulo térmico. Este comportamento sugere que o a atividade antinociceptiva promovida pelo EACH não envolve mecanismo de ação central, semelhantes aos analgésicos opioides.

Estes resultados observados com o extrato e frações de *C. hololeuca* assemelham-se aos resultados obtidos por Pérez-Guerrero e colaboradores (2001) onde extrato aquoso de *C. obtusifolia* promoveu um efeito significativo na redução da nocicepção induzida por estímulos químicos, no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, contudo não alterou o tempo de retirada ou lambadura da pata no teste do *hot-plate*, sugerindo efeito analgésico periférico.

O mesmo comportamento foi observado na avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, outra espécie do gênero *Cecropia*, que inibiu significativamente número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Segundo os autores, a análise cromatográfica deste extrato, previamente descrita por Costa e colaboradores (2011), identificou a presença das flavonas orientina, isoorientina e ácido clorogênico, compostos com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória reconhecida, que poderiam justificar as respostas promovidas pelo extrato (ARAGÃO et al., 2012).

Em estudos com o extrato das folhas de *Musanga cecropioides*, uma espécie de planta medicinal pertencente a mesma família do gênero *Cecropia* (Urticaceae), foi observado redução dose-dependente do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de forma semelhante a resposta promovida pelo EACH. O autor justifica que estes resultados estariam relacionados a um possível mecanismo analgésico periférico envolvendo ação direta em nociceptores, inibição direta da ação de prostaglandinas ou inibição da síntese de prostaglandinas por redução da atividade da cicloxigenase (SOWEMIMOA et al., 2015).

Em estudo desenvolvido por Filho e colaboradores (2008), a quercetina inibiu de forma dose-dependente o comportamento nociceptivo induzido pela administração intraperitoneal de ácido acético, no modelo de contorções abdominais. A quercetina é um importante flavonoide encontrado na natureza, extensivamente estudado devido a seus efeitos biológicos e sua estrutura química corresponde a aglicona precursora da rutina, um dos flavonoides identificados na análise fitoquímica de *Cecropia hololeuca*.

O tratamento com o extrato aquoso de *Cecropia hololeuca* e suas frações aquosa e orgânica sugerem que o mecanismo antinociceptivo destes compostos pode estar relacionado

com uma diminuição da síntese de mediadores inflamatórios em tecidos periféricos ou por bloqueio direto de seus receptores, o que resulta em um efeito antinociceptivo. Além disso, essa atividade poderia ser causada por um aumento do limiar nociceptivo ou por interrupção na transmissão do estímulo da dor à fibra nervosa (ÖZKAY et al., 2013).

A prostaglandina pode ser um dos mediadores inflamatórios periféricos com síntese ou ação inibidos pelo EACH, uma vez que o extrato inibiu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, que tem sido associado à nocicepção mediada por PGE₂ e PGI₂ (SULAIMAN et al., 2009, LE BARS et al., 2001). Outros mediadores inflamatórios podem estar envolvidos nos efeitos antinociceptivos promovidos pelo EACH no modelo de contorções induzidas pelo ácido acético, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-8. Estudos demonstram que esses mediadores são liberados na cavidade peritoneal por macrófagos residentes ou mastócitos estimulados pela administração intraperitoneal de ácido acético (YIN et al., 2016). Entretanto, como o método de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é pouco específico, sempre são necessários novos ensaios para confirmar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos com a antinocicepção obtida neste extrato e frações (ÖZKAY et al., 2013).

Considerando os resultados obtidos no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, bem como a inexistência de efetividade do EACH no modelo de imersão da cauda, levantamos a hipótese de que a atividade antinociceptiva do EACH estaria relacionada a propriedades anti-inflamatórias. Para investigar esta proposta, o EACH foi avaliado utilizando o teste da pleurisia induzida por carragenina.

Pleurisia é uma inflamação da pleura parietal que geralmente resulta em dor pleurítica e tem uma variedade de causas prováveis. A carragenina, membro da família de polissacarídeos naturais derivados de certas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta), foi extraído pela primeira vez em 1837 e há muito tempo é utilizado pela indústria alimentícia como agente formador de gel para processamento de alimentos. Essa classe de polissacarídeos pode causar efeitos biológicos adversos para o organismo, como incitar a resposta imune indesejada e inibir a coagulação sanguínea (LIU et al., 2015).

A aplicação de carragenina no espaço pleural conduz a pleurisia, caracterizada pela infiltração de polimorfonucleares (PMN), extravasamento de proteínas vasculares no sítio inflamatório e lesão pulmonar (FRÖDE et al., 2002). O lavado pleural dos animais submetidos a esta inflamação apresenta um aumento na concentração de mediadores pró-inflamatórios, por isso, modelos animais de pleurisia induzida por carragenina têm sido amplamente utilizada para investigar a fisiopatologia da inflamação aguda e também avaliar a eficácia de diferentes tipos de drogas, fármacos e plantas medicinais no controle da inflamação (CUZZOCREA et al., 2003).

A avaliação da atividade anti-inflamatória pelo teste da pleurisia corroborou os resultados anteriores que indicavam envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios na atividade antinociceptiva observada no teste de contorções abdominais. Tanto o EACH como as frações orgânica (FBuCH) e aquosa (FAqCH) promoveram redução significativa no número de leucócitos que migraram para cavidade pleural. Contudo, alguns pontos importantes diferiram em relação aos dois modelos, de contorção abdominal e pleurisia. Primeiramente, entre as doses de EACH testadas (100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o.*), apenas a dose de 1000 mg/kg, *p.o.*, foi capaz de inibir significativamente a migração de leucócitos para cavidade pleural em relação ao veículo e de forma semelhante ao controle positivo dexametasona. Esse resultado exigiu que a dose de 1000 mg/kg do EACH fosse considerada para o cálculo das doses das FBuCH e FAqCH (Dose da FBuCH = 1000 mg/kg x 40% (rendimento da massa) = 400 mg/kg e a dose da FAqCH = 1000 mg/kg x 60% (rendimento da massa) = 600 mg/kg). Ambas as frações foram efetivas em inibir significativamente a resposta inflamatória induzida pela carragenina, reduzindo a migração de leucócitos para cavidade

pleural. No caso da FAqCH, ainda estipulamos mais duas doses para teste, de 60 e 180 mg/kg, *p.o.* e, neste caso, podemos observar um comportamento dose-dependente apresentando atividade anti-inflamatória significativa em todas as doses testadas.

No teste da pleurisia caminhamos mais um nível no fluxograma do estudo dos compostos isolados da *C. hololeuca*, ao testar a fração enriquecida em flavonoides (FEFCH). Devido a pouca massa para o ensaio com a FEFCH não foi respeitado o rendimento da fração e as doses estabelecidas foram 2,5; 5 e 10 mg/kg, *p.o.* As três doses demonstraram atividade anti-inflamatória importante com percentuais de inibição significativos e semelhantes, indicando que efetividade máxima desta fração no teste da pleurisia induzida por carragenina foi alcançada com a dose de 2,5 mg/kg, *p.o.*

Nossos resultados são corroborados pelos ensaios conduzidos por Müller e colaboradores (2016-A), onde a avaliação do comportamento do extrato aquoso de *Cecropia glasiovii*, uma espécie do gênero *Cecropia*, no modelo de pleurisia induzida por carragenina mostrou que a administração deste extrato promoveu atividade anti-inflamatória *in vivo* pronunciada, caracterizada pela inibição do influxo de leucócitos para cavidade pleural, pela redução na concentração TNF- α e IL-1 β na cavidade pleural e pela diminuição na capacidade do neutrófilo infiltrar-se no parênquima pulmonar.

Em outro ensaio desenvolvido pelo mesmo grupo no modelo de pleurisia induzida por carragenina, mas desta vez testando o extrato aquoso e uma fração enriquecida em flavonoides extraído de *Cecropia pachystachya*, os resultados forneceram evidências de efeito anti-inflamatório dos dois compostos, demonstrado pela diminuição nitrito e nitrato (metabólitos do óxido nítrico), pela inibição de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e pela redução a migração de leucócitos para o local da inflamação. A análise cromatográfica da fração enriquecida em flavonoides (CLAE) permitiu a identificação dos flavonoides C- glicosil, orientina, isorientina e isovitexina, como os principais compostos presente nesta fração, o que segundo a autora pode ter contribuído para os efeitos observados (MÜLLER, 2016-B). Em nossos experimentos, a análise fitoquímica da FFCH também demonstrou a presença de isorientina e isovitexina.

Em avaliação experimental do perfil farmacológico *Macrosiphonia longiflora*, desenvolvida por da Silva e colaboradores (2014), extrato hidro-etanólico desta espécie diminuiu significativamente a formação do exsudato pleural e o número de leucócitos que migraram para cavidade pleural, no modelo de pleurisia induzida por carragenina. A avaliação do extrato bruto, das frações butanólica e aquosa, e da rutina isoladas no estudo fitoquímico da *Ilex paraguariensis*, demonstrou atividade anti-inflamatória através da redução da migração de neutrófilos para o exsudato pleural e da redução da atividade da mieloperoxidase no modelo da pleurisia induzida por carragenina (LUZ et al., 2016).

Nossos resultados são semelhantes aos observados na avaliação do potencial anti-inflamatório de *Polygala molluginifolia*. O extrato bruto e frações isoladas desta espécie, no modelo da pleurisia induzida por carragenina, diminuíram a migração de neutrófilos, bem como, a concentração de exsudato pleural e a ativação de neutrófilos pela redução da atividade da mieloperoxidase. Adicionalmente inibiram a formação adenosina-deaminase, a concentração de óxido nítrico e a produção de TNF- α e IL-1 β no exsudato. A rutina, flavonoide identificado na análise fitoquímica da espécie, apresentou resultados semelhantes nos testes realizados, porém não inibiu a formação do óxido nítrico no exsudato. No mesmo estudo, a rutina apresentou importante inibição da ativação de NF- κ B que foi diretamente relacionada a diminuição da concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato (ARRUDA-SILVA et al., 2014).

A hipótese provável para redução da migração de neutrófilos promovida por EACH, FBuCH, FAqCH e FEFCH no modelo da pleurisia é a inibição de mediadores inflamatórios produzidos pela aplicação intra-torácica de carragenina. Mediadores lipídicos, como

prostaglandinas e leucotrienos, e citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 estão envolvidos na indução da pleurisia induzida por carragenina. Estes mediadores promovem acúmulo de neutrófilos e células mononucleares, ativam células endoteliais (FRÖDE et al., 2001) e promovem o extravasamento plasmático que contribui para a formação de exsudatos pleurais, atingindo seu pico quatro horas após a administração do agente flogístico (MENEGAZZI et al., 2008).

O recrutamento de células polimorfonucleares da circulação para o tecido inflamado exerce uma função fundamental na destruição e remodelamento do tecido lesado (IMPELLIZZERI et al., 2011). Além disso, os macrófagos participam da progressão da pleurisia experimental, produzindo citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β (CRISAFULLI et al., 2010). Evidências experimentais têm sugerido claramente que NF- κ B desempenha um papel central na regulação de um grande número de genes responsáveis pela geração de mediadores ou proteínas na inflamação pulmonar aguda induzida por carragenina, tais como TNF- α , IL-1 β , iNOS e COX-2 (IMPELLIZZERI et al., 2011). Portanto, também é possível que a atividade anti-inflamatória produzida pelo extrato aquoso e pelas frações isoladas de *Cecropia hololeuca* no teste da pleurisia tenha ocorrido em função dos efeitos inibitórios da ativação de NF- κ B, porém exigiriam investigações complementares para comprovar esta hipótese.

A diminuição da migração de neutrófilos também está relacionada a inibição da adenosina-deaminase, uma enzima presente em grandes quantidades no citoplasma de neutrófilos e diretamente envolvida no processo inflamatório. A inibição dessa enzima promove o aumento da adenosina, um autacóide com reconhecida atividade anti-inflamatória no pulmão (BLACKBURN et al., 2009). Segundo Favacho e colaboradores (2011), a inibição da migração de leucócitos pode ocorrer devido à supressão da produção de substâncias quimiotáticas e/ou inibição da expressão de moléculas de adesão.

Neste contexto, considerando os resultados obtidos com o extrato e frações da *Cecropia hololeuca* e os relatos descritos em estudos utilizando o modelo da pleurisia em outras espécies do gênero, acreditamos que o mecanismo inflamatório observado, embora ainda não elucidado, esteja relacionado a inibição destes mediadores inflamatórios ou quimiotáticos por um ou mais flavonoides identificados na fração flavonoídica (FFCH).

Após as avaliações das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória através dos testes das contorções abdominais e da pleurisia, cujos resultados revelaram o potencial fitoquímico da *Cecropia hololeuca*, para o prosseguimento do estudo, direcionando o isolamento e a identificação de frações e compostos ativos, se considerou a implementação de testes adicionais.

A imprescindível necessidade de redução do número de animais a serem utilizados nos experimentos, bem como a pequena quantidade (massa) de material fitoquímico disponível e fornecido, exigiu a busca de uma forma mais parcimoniosa da utilização de recursos. Ocorreu assim a escolha e a padronização no Laboratório de Inflamação do DCFis do modelo de artrite induzida por zimosan (PINTO et al., 2010), que permitiu avaliar em um único modelo, a efetividade do material a ser testado sobre três importantes eventos do processo inflamatório: a formação do edema (atividade anti-edematogênica), a nocicepção (atividade antinociceptiva) e a migração de leucócitos (atividade anti-inflamatória), proporcionando assim, benefícios científicos, bioéticos e econômicos.

Além disso, se considerou a importância crescente da artrite a cada ano, na medida em que observamos uma tendência de envelhecimento na população com conseqüente acréscimo de população idosa quando comparado à população jovem, aumentando seu impacto na saúde pública, com a subsequente sobrecarga econômica nos sistemas de saúde de praticamente todo o mundo (LAIRES, 2011).

A artrite aguda induzida por zimosan em camundongos foi primeiramente descrita por Keystone, em 1977. Os mecanismos que medeiam o reconhecimento e a fagocitose do zimosan *in vivo* são complexos e os fagócitos, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, expressam receptores que estão implicados na resposta celular ao zimosan. *In vivo*, tem servido como modelo para estudo da resposta imune inata, porque é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e podem ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas. Modelos experimentais de artrite induzida por zimosan em joelhos demonstram aumento da permeabilidade vascular promovendo edema local, migração celular com predominância de polimorfonucleares e nocicepção (FRASNELLI et al., 2005).

A aplicação intra-articular de zimosan resulta em resposta inflamatória intensa, com infiltração de neutrófilos, extravasamento plasmático, aumento dos níveis de óxido nítrico e da hipernocicepção mecânica. O edema induzido por zimosan é significativo já na primeira hora e amplificado durante a terceira e quarta hora após a aplicação, a hipernocicepção mecânica atinge seu pico quatro horas após a indução da artrite e o influxo celular de leucócitos encontra valores máximos na sexta hora (CHAVES et al., 2011). Em modelos experimentais de inflamação articular verificou-se que as primeiras células que migram para a articulação são os neutrófilos (BOMBINI et al, 2004).

Na avaliação com o modelo de artrite induzida por zimosan, além de avaliar EACH, FAqCH, FBuCH e FEFCH como nos modelos de contorção e pleurisia, progredimos mais duas etapas no estudo bioguiado da *Cecropia hololeuca* ao testar as frações isoladas de FEFCH (FFCH e SCH) e também a rutina, flavonoide identificado no estudo fitoquímico da desta espécie. As doses estipuladas seguiram os seguintes critérios:

- EACH foi avaliada apenas na dose de 1 g/kg, *p.o.*, pois foi a única dose a inibir significativamente a migração de leucócitos no teste da pleurisia.
- FAqCH nas doses de 180 e 600 mg/kg, *p.o.*, foram as mais significativas no teste da pleurisia.
- FBuCH na dose de 400 mg/kg, *p.o.*, como no teste da pleurisia.
- FEFCH no teste da pleurisia foi avaliada nas doses de 2,5, 5, e 10 mg/kg, não respeitando o rendimento devido a quantidade reduzida de massa. Apesar disso mostraram importante atividade anti-inflamatória e foram repetidas para o modelo de artrite voltando a reproduzir as mesmas efetividades. Contudo os resultados da avaliação do edema apesar de significativo não foram tão expressivos e no teste de Von Frey não inibiram significativamente a nocicepção induzida pelo zimosan. Por isso foram adicionadas as doses de 50 e 100 mg/kg.
- FFCH e SCH nas doses de 45 e 55 mg/kg, respectivamente, de acordo com o rendimento e os resultados obtidos pela dose de 100 mg/kg da FEFCH (FFCH = 45% x 100= 45 mg/kg e SCH=55% x 100= 55 mg/kg).
- Rutina foi avaliada na dose de 30 mg/kg, *p.o.*, seguindo dados da literatura (MARIANO, 2017). A mesma dose de rutina foi usada para avaliar a concentração de TNF- α intra-articular, juntamente com o EACH (1g/kg, *p.o.*).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que quase todos os compostos obtidos a partir do fracionamento do extrato da *Cecropia hololeuca* (EACH) demonstraram ser capazes de inibir a formação do edema articular, a nocicepção e a migração de neutrófilos induzidas pela administração intra-articular do zimosan, em pelo menos uma das doses testadas. A única exceção, ocorreu com o composto SCH (55 mg/kg, *p.o.*), isolado a partir da fração enriquecida em flavonoides (FEFCH), que não apresentou qualquer evidência de inibição significativa para as atividades avaliadas. Na avaliação do mecanismo de ação os

animais tratados com EACH (1g/kg, *p.o*) e rutina (30 mg/kg, *p.o*) inibiram o aumento de TNF- α articular induzida pelo zimosan.

Nossos resultados demonstram a importância do modelo de artrite induzida por zimosan na pesquisa da atividade anti-inflamatória e são semelhantes aos encontrados por Oliveira e colaboradores (2015), que avaliaram a atividade anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato acetato de etila da polpa de fruta de *Caryocar coriaceum* no mesmo modelo. Os autores demonstraram que administração de diferentes doses do extrato diminuíram a formação do edema, a incapacidade articular (nocicepção) e a migração de neutrófilos induzidas pela administração intra-articular do zimosan. A nocicepção foi avaliada pelo teste de incapacitação articular que considera que a nocicepção é proporcional ao tempo que o animal permanece com a pata suspensa após a aplicação do agente inflamatório (TONUSSI & FERREIRA; 1992). Adicionalmente, mostraram que o extrato foi capaz de diminuir a concentração da mieloperoxidase no líquido sinovial, uma enzima presente no neutrófilo e com um importante papel no dano tissular durante o processo inflamatório, e diminuir a concentração de TNF- α e COX-2 no tecido sinovial por imunohistoquímica sugerindo que a inibição destes mediadores, poderiam responder pelas atividades promovidas pelo extrato.

O mesmo foi observado na avaliação do efeito anti-inflamatório de extrato hidroalcoólico das folhas *Schinus terebinthifolius* que no mesmo modelo de artrite, promoveu redução na espessura da articulação (formação do edema) e diminuição do influxo de neutrófilos para cavidade articular. Além disso, a análise do líquido sinovial por ELISA mostrou que o extrato de *S. terebinthifolius* inibiu as interleucinas sinoviais IL-6, IL-1 β e TNF- α e a quimiocina CXC ligante (CXCL1/KC), que possuem um importante papel na migração de neutrófilos (ROSAS et al., 2015).

Garcia e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato etanólico de *Echinodorus grandiflorus* inibiu significativamente a formação do edema de pata induzido pela aplicação intra-plantar de carragenina, avaliados com auxílio de um pletismômetro. Segundo o estudo essas atividades estariam relacionadas à ação da isovitexina e da isoorientina, separada ou sinergicamente com outros compostos isolados como diterpenos ou ácido trans-aconítico. A isovitexina e isoorientina, flavonoides identificados por cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE) na análise fitoquímica do extrato etanólico *Echinodorus grandiflorus* também foram identificadas em nossos estudos com a FFCH de *C. hololeuca*.

Experimentos com extrato metanólico das partes aéreas de *Hypericum scabroides* produziram atividade anti-edematogênica significativa em modelo de edema de pata induzida por carragenina. A análise fitoquímica do extrato metanólico desta espécie revelou a presença compostos fenólicos isoquercitrina, rutina e ácido clorogênico que, segundo os autores, poderiam estar envolvidos nas atividades observadas (MANSOUR et al., 2014).

Em relação a rutina especificamente, diversos estudos tem relatado seus efeitos farmacológicos, incluindo a atividade anti-oxidante, citoprotetora, anticarcinogênica, cardioprotetora e anti-inflamatória (GANESHPURKAR & SALUJA, 2017). Em relação a atividade anti-inflamatória alguns estudos corroboraram nossos resultados.

Guardia e colaboradores (2001), avaliaram o efeito da rutina na fase aguda e crônica da formação do edema. A rutina administrada uma vez ao dia durante 30 dias foi capaz de reduzir a formação do edema induzida pela aplicação intra-pantar de carragenina, mensurada através de um pletismografo, na fase aguda (três a cinco horas) e na fase crônica (7 a 30 dias), porém foi mais efetiva na fase crônica demonstrando claramente que este flavonoide foi efetivo na redução do edema

Adefegha e colaboradores (2017), demonstraram experimentalmente que a rutina promoveu efeito anti-inflamatório através da inibição significativa da migração de leucócitos para cavidade pleural, bem como pela diminuição da concentração de espécies reativas de

oxigênio e da apoptose celular, diminuindo a lesão aguda de pulmão, em modelo de pleurisia induzida por carragenina.

A atividade antinociceptiva promovida pela rutina em nossos experimentos são corroborados pelos resultados encontrados na avaliação fração clorofórmica alcalina de *Excoecaria agallocha* onde foi observado a diminuição significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Após a análise por CLAE foram identificados um grupo de compostos fenólicos, dentro os quais se destacava a rutina como composto majoritário. Adicionalmente foi demonstrado a capacidade da rutina se ligar fortemente as enzimas COX-1 e COX-2, sugerindo sua atividade antinociceptiva periférica (SELVARAJ et al., 2014).

Atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória da rutina observada no presente trabalho estão alinhadas aos achados descritos por uma Umar e colaboradores (2012), onde a rutina inibiu a formação do edema de pata e atividade anti-oxidante de neutrófilos em modelo de artrite induzida por colágeno. Adicionalmente, no mesmo trabalho, a rutina reduziu a concentração de óxido nítrico no líquido sinovial e as alterações histopatológicas evidenciadas pela diminuição do infiltrado celular, da degeneração da cartilagem articular e da hiperplasia da membrana sinovial. O óxido nítrico é uma molécula de sinalização importante, produzida como parte da resposta inflamatória de células ativadas e macrófagos. A produção excessiva de óxido nítrico induzido por citocinas inflamatórias em articulações artríticas tem sido associada ao início da apoptose de condrócitos (SHUKLA et al., 2008).

Rutina foi capaz de reduzir o edema de pata induzida por um composto formado pela mistura de complexo adjuvante de Freud com parede celular de *Candida albicans* (500 µg) em modelo de artrite séptica. Nestas condições a rutina inibiu o edema de pata produzido pela mistura a partir do 7º dia encontrando valores significativos no 11º dia quando comparado ao veículo e, no 17º dia, a inibição do edema foi significativamente maior que o controle positivo indometacina (HAN, 2009).

Em modelo de artrite induzida por adjuvante (aplicação de *Mycobacterium butyricum* inativado), a rutina inibiu os sinais clínicos de artrite em ratos, avaliados através de scores de progressão da doença. Os achados clínicos foram correlacionados com a inibição da expressão de genes em cultura de macrófagos humanos ativados e a liberação de óxido nítrico, TNF- α , IL-1 e IL-6 (KAUSS et al., 2008). Em doenças reumáticas, como a artrite reumatóide, pacientes apresentam aumento no número de monócitos circulantes no sangue periférico e elevado número de macrófagos na articulação. Estas células, quando ativadas, são umas das principais produtoras de TNF- α e IL-1, duas citocinas essenciais na progressão da artrite por estimular a liberação de outras citocinas e ativar metaloproteínases (KAWANAKA et al., 2002).

Da mesma forma, em estudo *in vitro* que avaliou a formação de osteoclastos derivado de macrófagos na medula óssea em estágios iniciais, a rutina diminui os níveis de TNF- α e espécies reativas de oxigênio, via inibição da ativação de NF- κ B (KYUNG et al., 2008).

A rutina também diminui significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-18 e TNF- α , através da inibição da ativação do receptor NLRP3 (nucleotide-binding domain-like receptor), 72 horas após lesão de medula espinhal, em modelo neuroinflamação por compressão medular em ratos. Adicionalmente, também promoveu recuperação funcional e diminuição de danos observados através de análise histopatológica (WU et al., 2016).

Diante das respostas produzidas pelas frações isoladas das folhas da *C. hololeuca* é possível que um ou mais flavonoides, incluindo a rutina, sejam responsáveis pelas atividades observadas. Segundo Khanna e colaboradores (2007) agentes derivados de plantas, como os polifenóis, que podem modular a expressão dos sinais pró-inflamatórios claramente têm potencial contra artrite.

Com base em informações obtidas na revisão da literatura, os resultados do presente estudo sugerem que a inibição do TNF- α induzido pela rutina tenha um papel central na inibição da formação do edema, da nocicepção e migração de leucócitos para cavidade articular, promovida por extratos e frações de *Cecropia hololeuca*. O TNF- α tem um papel crucial no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória durante a resposta inflamatória em ratos, sendo altamente expressa no líquido sinovial de pacientes com distúrbios da articulação e sugerindo que os efeitos antinociceptivos encontrados poderiam estar relacionados à inibição desta citocina (ALVES et al., 2017).

Segundo Venkatesha e colaboradores (2011), o TNF- α desempenha um papel fundamental na promoção da degradação da cartilagem na artrite e na ativação de células endoteliais, na gênese da hipernocicepção inflamatória mecânica em ratos e a resposta nociceptiva em camundongos. Estudos com fármacos inibidores desta citocina (anti-TNF- α) tais como a talidomida e a pentoxifilina, têm ação analgésica efetiva devido à sua capacidade de inibir a produção de TNF- α por células sinoviais, reduzindo rapidamente os sinais e sintomas no tratamento da artrite.

Estudos têm demonstrado que a participação da maioria dos mediadores inflamatórios ligados a artrite, não só TNF- α , mas também IL-1, IL-6, quimiocinas e enzimas inflamatórias como cicloxigenase-2 (COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX) são regulados pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (KHANNA et al., 2007).

Embora novos estudos sejam necessários para elucidar o completo mecanismo de ação e o principal composto responsável pelas atividades anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato e frações da *Cecropia hololeuca*, nós podemos sugerir com base nos resultados apresentados que esta espécie foi capaz de inibir sinais pró-inflamatórios e apresentar potencial anti-artrítico, oferecendo a possibilidade de desenvolver agentes terapêuticos promissores em um dos mais importantes problemas de saúde mundial e que é caracterizado pela utilização de fármacos anti-inflamatórios associados a reações adversas pelo uso prolongado e ao alto custo do tratamento.

10. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pela análise fitoquímica e biológica do extrato e frações isolados de *Cecropia hololeuca* podemos concluir que:

- A partição do extrato aquoso de *C. hololeuca* (EACH) em *n*-butanol gerou uma fração orgânica rica em compostos fenólicos (FBuCH) e uma fração aquosa residual (FAqCH).
- Fracionamentos posteriores foram realizados com o objetivo produzir uma fração flavonoídica (FFCH) e permitir o isolamento e identificação de compostos fenólicos. A análise cromatográfica da FEFCH (CLAE-DAD) demonstrou a presença dos flavonoides c-glicosilados 2''-O-glicosil-isorientina, isorientina, 2''-O-glicosil-isovitexina, rutina, isovitexina e isoquercitrina.
- O efeito antinociceptivo do EACH envolve mecanismos anti-inflamatórios, evidenciado pela inibição significativa das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 1,2% (100-1000mg/kg, *p.o.*) e da migração de neutrófilos para cavidade pleural no modelo de pleurisia induzida por zimosan (1000 mg/kg, *p.o.*).
- O EACH (1000mg/kg, *p.o.*), de acordo com os testes de imersão da cauda e do rota-rod, não possui mecanismos de ação central envolvidos na resposta antinociceptiva ou afeta a motricidade, respectivamente, reforçando a especificidade do composto como agente antinociceptivo periférico.
- O EACH (1000mg/kg, *p.o.*) apresentou atividade anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de artrite induzida por zimosan.
- A FBuCH reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e a migração de neutrófilos no modelo da pleurisia induzida por carragenina, respectivamente nas doses de 120 e 400 mg/kg, administrados por via oral. A dose de 400 mg/kg, *p.o.*, também reduziu significativamente o edema, a nocicepção e a inflamação induzida pelo zimosan.
- A FAqCH apresentou resultados semelhantes nos testes de contorções (180 mg/kg, *p.o.*) e pleurisia (60, 180 e 600 mg/kg, *p.o.*). Porém, no modelo de artrite foram testadas apenas as doses de 180 e 600 mg/kg e, apenas a dose de 600 mg/kg reduziu significativamente os três parâmetros avaliados neste modelo. A FAqCH na dose de 180 mg/kg não foi capaz de inibir significativamente o edema e a hipernocicepção induzidas pelo zimosan.
- A FEFCH no modelo da pleurisia, inibiu significativamente a migração de leucócitos em todas as doses testadas (2,5, 5 e 10 mg/kg, *p.o.*) evidenciando percentuais de inibição muito parecidos o que sugere que a atividade máxima foi obtida com a menor dose (2,5 mg/kg). No modelo da artrite, as doses de 2,5 e 5 mg/kg, *p.o.* não foram capazes de inibir a redução do limiar na avaliação da hipernocicepção mecânica através do teste de Von Frey. Apenas as doses de 50 e 100 mg/kg, *p.o.* inibiram significativamente a formação do edema, a nocicepção e a migração de leucócitos induzidas pelo zimosan.
- A FFCH (45 mg/kg, *p.o.*) e rutina (30 mg/kg, *p.o.*) apresentaram atividade anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória ao inibir significativamente aumento do diâmetro articular, a redução do limiar nociceptivo pelo teste de Von Frey e o número de leucócitos que migraram para o espaço articular, induzidos pela aplicação intra-articular de zimosan. A ausência efetividades

observadas com SCH (55 mg/kg, *p.o.*) indicam que esta fração não participou dos efeitos biológicos promovidas pela FEFCH.

- A rutina (30 mg/kg, *p.o.*) e o EACH inibiram a formação de TNF- α articular induzido pela administração intra-articular de zimosan.

Nossos experimentos comprovam que o modelo de artrite induzida por zimosan é um excelente método para estudos que investiguem mecanismos subjacentes à inflamação pois promove aumento da permeabilidade vascular com formação de edema articular, hipernocicepção e migração de neutrófilos.

Os achados científicos comprovam que extratos e frações isoladas de *Cecropia hololeuca* apresentam atividade anti-edematogênica, antinociceptiva e anti-inflamatória em todas as etapas do estudo embasando alguns relatos etnobotânicos que relacionam o uso desta espécie e gênero a doenças que cursam com dor e inflamação. A diminuição dos níveis de TNF- α intra-articular, promovidos pela rutina e pelo EACH, esclarecem em parte o mecanismo de ação envolvido nas atividades observadas.

Adicionalmente, o presente estudo cria a perspectiva de que novos trabalhos sejam realizados para investigar potencial farmacológico dos compostos flavonoides identificados na prospecção fitoquímica da *Cecropia hololeuca*, bem como para elucidar o completo mecanismo de ação envolvido nas atividades evidenciadas e, desta forma, conduzir à prospecção de novas moléculas bioativas com vistas à atividades analgésicas e anti-inflamatórias promissoras.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHEEM, I.T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 107, p. 742–750, 2010.

ADEFEGHA, S.S.; LEAL, D.B.R.; DE OLIVEIRA, J.S.; MANZONIC, A.G.; BREMMC, J.M. Modulation of reactive oxygen species production, apoptosis and cell cycle in pleural exudate cells of carrageenan-induced acute inflammation in rats by rutin. *Food and Funct*, v.8, p. 4459-4468, 2017.

ADEGBOLA, P.; ADERIBIGBE, I.; HAMMED, W.; OMOTAYO, T. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review. *American Journal of Cardiovascular Disease*, v. 7, n. 2, p. 19-32, 2017.

AHMED, A.U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, v. 6, n. 4, p. 274–281, 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 678-689, 2006.

AL-ENAZI, M.M. Ameliorative potential of rutin on streptozotocin-induced neuropathic pain in rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, n. 41, p. 2743-2754, 2013.

ALENCAR, M.M.A.; ROCHA, M.F.G.; PINHEIRO, D.C.S.N. Inflammation and its modulation by nosteroidal anti-inflammatory drugs: risks and benefits. *Ciência Animal*, v.15, n. 1, p. 33-41, 2005.

ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 139, p. 189–212, 2013.

ALVAREZ-JUBETE, H. W.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, v.119, p. 770-778, 2010.

ALVES, G.S.P.; POVH, J.A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiuba, MG. *Biotemas*, v. 26, p. 231–242, 2013.

ALVES, S.M.; ABREU, S.C.; LEMOS, J.C.; GOMES, F.I.F.; ALVES S.M.; DO VAL, D.R.; FREITAS, R.S.; PEREIRA, K.M.A.; PINTO, V.T.P.; BRITO, G.A.C.; BEZERRA, M.M.; CRISTINO-FILHOA, G.; CHAVESA, H.V. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition, *Pharmacological Reports*, v. 69, p. 764–772, 2017.

ANDERSON, G.M.; NAKADA, M.T.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, p. 314–320, 2004.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.78, p.145-149, 2001.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.161, p.105-121, 2009.

ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J. C.; R. GARCIA, M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia Pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n.3, p.629–633, 2010.

ARAGÃO, D.M.; LIMA, I.V.; DA SILVA, J.M; BELLOZI, P.M.; DA COSTA, J.C.; CARDOSO, G.M.; SCIO, E. Anti-Inflammatory, Antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 6, p. 926-930, 2013.

ARANDA, J.V.; SALOMONE, F.; VALENCIA, G.B.; BEHARRY, K.D. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Newborns and Infants. *Pediatric Clinics of North America*, v. 64, p. 1327–1340, 2017.

ARJUMAND, W.; SETH, A.; SULTANA, S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF κ B, TNF- α and caspase-3 expression in wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 2013–2021, 2011.

ARRUDA-SILVA, F.; NASCIMENTO, M.V.P.S.; LUZ, A.B.G.; VENZKE, D.; QUEIROZ, G.S.; FRÖDE, T.S.; PIZZOLATTI, M.G.; DALMARCO, E.M. Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation. *International Immunopharmacology*, v. 19, p. 334–341, 2014.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators of Inflammation*.v.2005, n. 4, p. 228-232. 2005.

ASHKAVAND, Z.; MALEKINEJAD, H.; VISHWANATH, B.S. The pathophysiology of osteoarthritis, *Journal of Pharmacy Research*, v.7, p.132-138, 2013.

BANNENBERG, G.; SERHAN, C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1801, p. 1260–1273, 2010.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; NABAVI, S.F.; NABAVI, S.M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, v. 196, p. 44–68, 2017.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, v. 211, p. 39-50, 2012.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; GRÉGORY, S.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2010.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. Principles of Neuroscience. New York: Appleton and Lange; 2000. p. 472-491.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutin – structure, metabolism and pharmacological potency. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BERG, C. C.; ROSSELLI, P.F. *Cecropia. Flora Neotropica Monograph*, v.94, n.9, p.1-230, 2005.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.V.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS-JUNIOR, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale-verde-Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.15, p. 692–707, 2013.

BLACKBURN, M.R.; VANCE, C.O.; MORSCHL, E.; WILSON, C.N. Adenosine receptors and inflammation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 193, p. 215–69, 2009.

BOMBINI, G.; CANETTY, C.; ROCHA, F.F.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 496, p. 197-204, 2004.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v.3, p.1-8, 2007.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; GRAEL, C. F. F.; JUNIOR, N. L. N.; MONTE-MÓR, R. L. M. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.478-487, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 26, de 13 maio, Brasília, 2014.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência e Saúde coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.

CHAGAS, F.N.J. ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIMES MASCULINOS E FEMININOS DE *Cecropia* LOEFL. (URTICACEAE) DO RIO DE JANEIRO. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

CHAVES, H.V.; RIBEIRO, R.A.; DE SOUZA, A.M.B.; SILVA, A.A.R.; GOMES, A.S.; VALE, M.L.; BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.C. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 11 pp, 2011.

CHEN, W-Y.; HUANG, Y-C.; YANG, M-L., LEE, C-Y.; CHEN, C-J.; YEH, C-H.; PAN, P-H.; HORNG, C-T.; KUO, W-H.; KUAN, Y-H. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. *International Immunopharmacol*, v. 22, n. 2, p. 409-413, 2014.

COHENA, M.; QUINTNERB, J.; RYSEWYKC, S.V. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain Reports*, 7 p., 2018.

CONSOLINI A.E.; MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96.p. 417–422, 2005.

CONTE F. P.; MENEZES-DE-LIMA O. J. R.; VERRI W.A. J. R.; CUNHA F. Q.; PENIDO C.; HENRIQUES M. G. Lipoxin A (4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 161, n. 4, p. 11-24, 2010.

COOK, A.D.; CHRISTENSEN, A.D.; TEWARI, D.; MCMAHON, S.B.; HAMILTON, J.A. Cytokines and their receptors in inflammatory pain. *Trends in Immunology*, v. 1447, 16pp, 2017.

COSTA, G.M.; ORTMANN, C.F.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* Species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011 (B).

COSTA, G.M.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Natural Product Communications*, v.6, p.913-920, 2011 (A).

COUTAUX, A.; ADAM. F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, v. 72, p. 359–371, 2005.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COUTO, V.M.; VILELA.F.C.; DIAS,D.F.; NASCIMENTO,C.G.; GIUSTI-PAIVA,A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.134, p. 348-353, 2011.

CRISAFULLI, C.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; GALUPPO, M.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effects of liver x receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respiratory Research*, v. 11, n. 19, 15 p., 2010.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, 1981.

CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian journal of medical and biological research*. V. 37, N. 3, P. 401-407. 2004.

CUNHA, T.; VERRI, W.J.; SILVA, J.; POOLE, S.; CUNHA, F.; FERREIRA, S. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.102, p.1755-1760, 2005.

CUZZOCREA, S.; ROSSI, A. SERRAINO, I.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; DUGO, L.; GENOVESE, T.; CALABRO, B.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 73, p. 739-746, 2003.

D'AMOUR, F.; SMITH, D. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.72, p.74-79, 1941.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto Superiore Di Sanita*, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DA ROSA, C.; MACHADO, C.A. Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão. *Revista Brasileira Farmacologia*, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2007.

DA SILVA, A.O.; ALVES, A.D.; DE ALMEIDA, D.A.T.; BALOGUN, S.O.; DE OLIVEIRA, R.G.; AGUIAR, A.A.; SOARES, I.M.; ASCÊNCIO, P.G.M.; ASCÊNCIO, S.D.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 154, n. 2, p. 319-329, 2014.

DE FILIPPO, K.; DUDECK, A.; HASENBERG, M.; NYE, E.; VAN ROOIJEN, N.; HARTMANN, K.; GUNZER, M.; ROERS, A.; HOGG, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, v.121, n. 24, p. 4930-4937, 2013.

DE OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira Anestesiologia*, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

DENNIS, E.A.; NORRIS, P.C. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nature Review Immunology*, v. 15, n.8 p. 511–523, 2015.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia Básica e Aplicada*, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DRAY, A.; READ, S.J. Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Research and Therapy*, v. 9, n. 3, p. 2-12, 2007.

DUHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of American Pharmacy Association*. v.46, p.208-209, 1957.

FAVACHO, H.A.S.; OLIVEIRA, B.R.; SANTOS, K.C.; MEDEIROS, B.J.L.; SOUSA, P.J.C.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, n. 1, p. 105–114, 2011.

FILHO, A.W.; FILHO, V.C.; OLINGER, L.; DE SOUZA, M.M. Quercetin: Further Investigation of its Antinociceptive Properties and Mechanisms of Action. *Archives of Pharmacal Research*, v. 31, n. 6, p. 713-721, 2008.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S. M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 25, n.4, p. 575-584, 2010.

FRASNELLI, M.E.; TARUSSIO, D.; CHOBAS-PÉCLAT, V.; BUSSO, N.; SO, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 2, p. 370-378, 2005.

FREITAS, C.R., FREITAS, N.R., NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito anticarcinogênico da rutina, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster*. *Revista Perquirere*, v. 11, n. 1, p. 247-257, 2014.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. ; CALIXTO, J. B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, n. 3, p. 149-156, 2002.

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 13, n. 3, p. 162–168, 2001.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A.J. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 25, p. 149–164, 2017 (A).

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A.K. Protective effect of rutin on humoral and cell mediated immunity in rat model. *Chemico-Biological Interactions*, v. 273, p.154e159, 2017 (B).

GARCIA, E.F.; DE OLIVEIRA, M.A.; GODIN, A.M.; FERREIRA, W.C.; BASTOS, L.F.S.; COELHO, M.M.; BRAGA, F.C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v. 18, p. 80–86, 2010.

GARCÍA, E.R.; GUTIERREZ, E.A.; DE MELO, F.C.S.A.; NOVAES, R.D.; GONÇALVES, R.V. Flavonoids effects on hepatocellular carcinoma in murine models: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, 23 p., 2018.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMO, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTINEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Researach*, v. 58, p. 537–552, 2009.

GARLAND, E.L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v.39, p. 561–571, 2012.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C.A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*, v. 39, p. 1003-1018, 2013.

GAZAL, M.; ORTMANN, C.F.; MARTINS, F.A.; STRECK, E.L.; QUEVEDO, J.; DE CAMPOS, A.M.; STEFANELLO, F.M.; KASTER, M.P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F.H.; LENCINA, C.L. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, v.108, p. 10–17, 2014.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 96, p. 305-312, 2017.

GHOSH, S. Triterpene Structural Diversification by Plant Cytochrome P450 Enzymes. *Frontiers in Plant Science*, v.8, n. 1896, 2017.

GOMES, M.A.M.; NETO, N.C.M.; BISPO, I.G.A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*, v. 22, n. 6, p. 398-403, 2009.

GONÇALES, N. M. T.; GERENUTTI, M.; CHAVES, D. S de A.; VILA, M. M. D. C. A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia na cidade de Volta Redonda, RJ. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 4, p. 346-351, 2011.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, v. 56, p. 683–687, 2001.

GUERRERO, A.T.G.; VERRI JR., W.A.; CUNHA, T.M.; SILVA, T.A.; SCHIVO, I.R.S.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F.A.C.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 83, p. 122-130, 2008.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores características e funções fisiológicas. *Acta Médica Portuguesa*, v. 24, p. 967-976, 2011.

HAMINIUK, C.H.I.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 207–211, 2009.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 207–211, 2009.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C.R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapeutics industry: challenges and opportunities. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, n.8, p. 2559-2569, 2017.

HEINRICHER, M.M.; TAVARES, I.; LEITH, J.L.; LUMB, B.M. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain research review*, v. 60, n. 1, p. 214–225, 2009.

HENROTIN, Y.; SANCHEZ, C.; BALLIGAND, M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *The Veterinary Journal*, v.170, p. 113-123, 2005.

HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *Jornal de Pediatria*, v.82, n.5, 2006.

HONG, J.Y.; LIM, K.T. Effect of preemptive epidural analgesia on cytokine response and postoperative pain in laparoscopic radical hysterectomy for cervical cancer. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, v. 33, n. 1, p. 44–51, 2008.

HUBER, S.F.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

IMPELLIZZERI, D.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; PATERNITI, I.; DI PAOLA, R.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochemical Pharmacology*, v. 81, p. 636–648, 2011.

KACHLICKI, P.; PIASECKA, A.; STOBIECKI, M.; MARCZAK, L. Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques. *Molecules*, 2016.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEM, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 3, p. 628-633, 2003.

KANASHIRO, A.; PESSINI, A.C.; MACHADO, R.R.; MALVAR, D.C.; AGUIAR, F.A.; SOARES, D.M.; DO VALE, M.L.; DE SOUZA, G.E. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 296, p. 1631–1640, 2009.

KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. *Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KAUSS, T.; MOYNET, D.; RAMBERT, J.; AL-KHARRAT, A.; BRAJOT, S.; THIOLAT, D.; ENNEMANY, R.; FAWAZ, F.; MOSSALAYI, M.D. Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 10, 9 p., 2008.

KAWABE, J.I.; USHIKUBI, F.; HASEBE, N. Prostacyclin in Vascular Diseases - Recent Insights and Future Perspectives. *Circulation Journal*, v. 74, p. 837-842, 2010.

KAWAHARA, K.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1851, p. 414–421, 2015.

KAWANAKA, N.; YAMAMURA, M.; AITA, T.; MORITA, Y.; OKAMOTO, A.; KAWASHIMA, M.; IWAHASHI, M.; UENO, A.; OHMOTO, Y.; MAKINO, H. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, p. 2578-2586, 2002.

KELEPOURI, D.; MAVROPOULOS, A.; BOGDANOS, D.P.; SAKKAS, L.I. The Role of Flavonoids in Inhibiting Th17 Responses in Inflammatory Arthritis. *Journal of Immunology Research*, 11 pp, 2018.

KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, C. Zymosan-Induced Arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, v. 20, n.7, p. 1396-1401, 1977.

KHALID, S.; TUBBS, R.S. Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. *Cureus*, v. 9, n. 10, 14pp, 2017.

KHANNA, D.; SETHI, G.; AHN, K.S.; PANDEY, M.K.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNG, B.; AGGARWAL, A.; AGGARWAL, B.B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 7, p. 344–351, 2007.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KIM, H.; KONG, H.; CHOI, B.; YANG, Y.; KIM, Y.; LIM, M.J.; NECKERS, L.; JUNG, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceutical Research*, v. 22, n. 9, 2005.

KIM, H.S.; KIM, T.; KIM, M-K.; SUH, D.H.; CHUNG, H.H.; SONG, Y.S. Cyclooxygenase-1 and -2: Molecular Targets for Cervical Neoplasia. *Journal of Cancer Prevention*, v.18, n. 2, 2013.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTOCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Sciences*, v. 10, n. 5, p. 236-242, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews*, v.13, 159-175, 2013.

KOROTKOVA, M., JAKOBSSON, P-J. Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nature Review Rematology*, v.10, p. 229-242, 2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. v. 18, p. 412. 1959.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 16p, 2013.

KUYINU, E.L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, v. 11, n. 19, 27p, 2016.

KYUNG, T-W.; LEE, J-E.; SHIN, H-H.; CHOI, H-S. Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF- α by inhibiting activation of NF- κ B. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 40, n. 1, p. 52-58, 2008.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, v.8, n.1, p.47-52, 2001.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Review*, v. 7, p. 301–311, 2008.

LAIRES, P.; GOUVEIA, M.; BRANCO, J. O impacto económico das doenças reumáticas. *Observatório nacional das doenças reumáticas*, p.113-145, 2011.

LAMPROPOULOU-ADAMIDOU, K.; LELOVAS, P. KARADIMAS, E.V.; LIAKOU, C.; TRIANTAFILLOPOULOS. K.; DONTAS, I.; PAPAIOANNOU, N.A. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, v. 24, n.3, p. 263–71, 2014.

LARCHÉ, M.J.; SACRE, S.M.; FOXWELL, B.M. Pathogenic role of TNF- α in rheumatoid arthritis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms Rheumatoid Arthritis*, v. 2, n.3, p. 367-375, 2005.

LE BARS, d., GOZARIU, M., CADDEN, S.W. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, A.S.; ELLMAN, M.B.; YAN, D.; KROIN, J.S.; COLE, B.J.; VAN WIJNEN, A.J.; IM, H-J. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*, v. 527, p. 440–447, 2013.

LEE, W.; KU, S-K.; BAE, J-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*, *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 3048–3055, 2012.

LEE, Y.C.; NASSIKAS, N.J.; CLAUW, D.J. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Research and Therapy*, v. 13, n. 2, p. 2-11, 2011 (B).

LEITE, J. P. V. *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. 1º edição. São Paulo: Atheneu, 344p, 2008.

LI, X.; KIM, J.S.; WIJNEN, A.J.; IM, H.J. Osteoarthritic tissues modulate functional properties of sensory neurons associated with symptomatic osteoarthritis pain. *Molecular Biology and Evolution*, v. 8, n.8, p. 5335–5339, 2011.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; LIMA, E.Q.; SILVA, J.F. Toxidade Aguda de Rutina e Bixina de Bixa orellana. *Acta Farmacológica. Bonaerense*, v. 22, n. 1, p. 21-26, 2003.

LIMA-LANDMAN, M.T.R.; BORGES, A.C.R.; CYSNEIROS, R.M.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, v. 14, p. 314–320, 2007.

LITTLE, C.B.; ZAKI, S. What constitutes an “animal model of osteoarthritis” e the need for consensus? *Osteoarthritis and cartilage*, v. 20, p. 261-267, 2012.

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydrate Polymers*, v. 121, p. 27–36, 2015.

LIU, M.; YOKOMIZO, T. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergology International*, v. 64, p. 17-26, 2015.

LOPES, P.R.R.; CAMPOS, P.S.F.; NASCIMENTO, R.J.S. Pain and inflammation in temporomandibular dysfunctions: the last four years review. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.10, n.3, p. 317-325, 2011.

LORENZ, H.; RICHTER, W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, v. 40, p. 135-163, 2006.

LUZ, A.B.G.; SILVA, C.H.B.; NASCIMENTO, M.V.P.S.; FACCHIN, B.M.C.; BARATTO, B.; FRÖDE, T.S.; REGINATTO, F.H.; DALMARCO, E.M. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. *International Immunopharmacology*, v. 36, p. 165–172, 2016.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALFAIT, A.M.; LITTLE, C.B.; MCDUGALL, J.J. A commentary on modelling osteoarthritis pain in small animals. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 21, p. 1316-1326, 2013.

MALVAR, D.C.; FERREIRA, R.T.; CASTRO, R.A.; CASTRO, L.L.; FREITAS, A.C.C.; COSTA, E.A.; FLORENTINO, I.F.; MAFRA, J.C.M.; SOUZA, G.E.P.; VANDERLINDE, F.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of 1,5-diphenyl-1H-Pyrazole-3-carbohydrazide, a new heterocyclic pyrazole derivative. *Life Sciences*, v. 95, p. 81-88. 2014.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C., JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANSOUR, S.; DJEBLI, N.; OZKAN, E.E.; MAT, A. In vivo antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, p. 514-520, 2014.

MAQUIAVELI, C.C.; DASILVA, E.R.; FRANCESCATO, H.D.C.; COSTA, R.S.; SILVA, C.G.A.; CASARINI, D.E. FONCHI, A.F.; COIMBRA, T.M. BRAZILIAN EMBAÚBA (*CECROPIA PACHYSTACHYA*) EXTRACT REDUCES RENAL LESION IN 5/6 NEPHRECTOMIZED RATS. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System*, p. 1–10, 2014.

MARIANO, G.M.D. Avaliação dos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório de extratos, frações e compostos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Vassourinha de botão). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, UFRRJ. Seropédica, Rio de Janeiro, 2017.

MARNETT, L.J. The COXIB experience: A look in the rear-view mirror. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.49, p.265-290, 2009.

MAYADAS, N.; CULLERE, X.; LOWELL, C.A. The Multifaceted Functions of Neutrophils Tanya. *Annual Review of Pathology*, v. 9, p. 181–218, 2015.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, p. 771-776, 2010.

MENEGAZZI, M.; DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; CRISAFULLI, C.; DAL BOSCO, M.; ZOU, Z.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Pharmacological Research*, v. 58, n. 1, p. 22–31, 2008.

MILTONPRABU, S.; TOMCZYK, M.; WOZNIAK, K.S.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; NABAVI, S.F.; ALAVIAN, S.M.; NABAVI, S.M. Hepatoprotective effect of quercetin: from chemistry to medicine. *Food and Chemical Toxicology*, p. 1-10, 2016.

MISHRA, A.; KUMAR, S.; PANDEY, A.B. Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.

MOBASHERI, A. MARK, B. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, v. 59, p. 333–339, 2016.

MOHAMMAD F, E.; HASAN, W.A.; MOHAME, E.G. Rutin and meloxicam attenuate paw inflammation in mice: Affecting sorbitol dehydrogenase activity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2017.

MOMIN, A.; MCNAUGHTON, P.A. Regulation of firing frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Experimental Brain Research*, v. 196, p. 45–52, 2009.

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Fatty acids: a review. *Journal of Brazilian Society for Food and Nutrition*, v.24, p.105-123, 2002.

MÜLLER, D.S.; FLORENTINO, D.; ORTMANN, C.F.; MARTINS, F.A.; DANIELSKI, L.Ç.; MICHELS, M.; CONSTANTINO, D.S.; PETRONILHO, F.; REGINATTO, F.H. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 185, p. 255–262, 2016 (A).

MÜLLER, S.D. Estudo das atividades anti-oxidante e anti-inflamatória de *Cecropia glaziovii* Sneth e *Cecropia pachystachya* Trécul, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2016 (B).

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*, v. 14, p. 675–690, 2015.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; NORREM, K.; LEEUWEN, P. A. M., Flavonoids: a review of probable mechanisms action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p. 418-25, 2001.

NIKFARJAM, B.A.; ADINEH, M.; HAJIALI, F.; NASSIRI-ASL, N. Treatment with rutin - a therapeutic strategy for neutrophil-mediated inflammatory and Autoimmune diseases - Anti-inflammatory effects of rutin on neutrophils. *Journal of Pharmacopuncture*, v. 20, n.1, p. 52-56, 2017.

NINAHUAMAN, M. F. M. L.; SOUCCAR, C.; M.T.R, A.J.;LIMA-LANDMAN, M.T.R. Activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine*, v.14, n. 5, p. 321-327, 2007.

OLIVEIRA JÚNIOR, J.O.; PORTELLA JUNIOR, C.S.A.; COHEN, C.P. Inflammatory mediators of neuropathic pain: *Mediadores inflamatórios na dor neuropática*. *Revista da dor*, v. 17, p. 35-42, 2016.

OLIVEIRA, F.F.B.; ARAÚJO, J.B.C.; PEREIRA, A.F.; BRITO, G.A.C.; GONDIM, D.V.; RIBEIRO, R.A., MENEZES, I.R.A.; VALE, M.L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 174, p. 452–463, 2015.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine*, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013.

ÖZKAY, U.D.; CAN, O.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 109, p. 23–30, 2013.

PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. *Einstein*, v. 13, n. 3, p. 469-73, 2015.

PAUL, A.T.; GOHIL, V.M.; BHUTANI, K.K. Modulating TNF- α signaling with natural products. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 15/16, p. 725-732, 2006.

PERAZA, G.G.; RODRIGUES, S.T.; MEDEIROS, S.H.L.; MUCCILLO-BAISCH, A.L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. *Vittalle*, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios anti-oxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.3, n.4, 2012.

PÉREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; ORTIZ, R.; DE SOTOMAYOR, M.A.; FERNÁNDEZ, M.A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 279–284, 2001.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews*, v.8, p. 71-80, 2007.

PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *Journal of Immunology*, v. 180, p. 6439–6446, 2008.

PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; COSTA, G.M.; KAPPEL, V.D.; DE OLIVEIRA, S.Q.; FORTUNATO, J.; CITTADINI-ZANETTE, V.; MOREIRA, J.C.; SIMÕES, C.M.; DAL-PIZZOL, F.; REGINATTO, F.H. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 7, p. 911-918, 2012.

PIEL, M.J.; KROIN, J.S; VAN WIJNEN, A.J.; KC, R.; IM, H-J. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. *Gene*, v. 537, p. 184–188, 2014.

PINHEIRO, B.; SILVA, A.; SOUZA, G.; FIGUEIREDO, J.; CUNHA, F.; LAHLOU, S.; DA SILVA, J.K.; MAIA, J.G.; SOUSA, P.J. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *Journal of Ethnopharmacol*, v. 188, p. 479-486, 2011.

PINTO L.G.; CUNHA T.M.; VIEIRA S.M.; LEMOS H.P.; VERRI W.A. JR.; CUNHA F.Q.; FERREIRA S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*, 148(2):247-56, 2010.

PINTO, W.B.V.R.; KO, G.M. Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v.1 n.2, p. 202-212, 2012.

POMONIS, J.D.; BOULET, J.M.; GOTTYSHALL, S.L.; PHILLIPS, S.; SELLERS, R.; BUNTON, T.; WALKER, K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*, v. 114, p. 339-346, 2005.

PORTER, D.G. Ethical scores for animal experiments. *Nature*, v. 356, n. 6365, p.101-102, 1992.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD. F.; BARSNESS, K.A.; ARYA, J.; HARKEN, A.H. Cytokines for surgeons. *American Journal os Surgery*, v.183, p. 268-272, 2002.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, H.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 8, p. 229-235, 2009.

REVILLA-MONSALVE, M.A.; ANDRADE-CETTO, A.; PALOMINO-GARIBAY, M.A.; WIEDENFELD, H.; ISLAS-ANDRADE, S. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 636–640, 2007.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.31, p. 986–1000, 2011.

RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 302, n. 3, p. 839-845, 2002.

RIVERA-MONDRAGÓN, A.; ORTIZ, O.O.; BIJTTEBIER, S.; VLIETINCK, A.; APERS, S.; PIETERS, L.; CABALLERO-GEORGE. C. Optimization of extraction conditions for total flavonoids, chlorogenic acid and flavolignans contents from *Cecropia* sp. leaves using design-of-experiments methodology, *Pharmaceutical Biology*, v.55, p.1500-1512, 2017.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. *Holos*, v. 1, n.31, p. 49-61, 2015.

ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO JR, A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*, v. 48, p: 485-490, 1999.

ROCHA, F.A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ROCHA, J.C.S.; GIRÃO, V.C.C.; BEZERRA, M.M.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Blockade of Leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. *European Journal of Pharmacology*, v. 497, p. 81-86, 2004.

ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M.M.; DE LIMA, T.C.M.; LAPA, A.J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents – In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*, v. 14, p. 396–402, 2007.

ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A., ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *British Journal of Pharmacology*; v. 136, p.588-596, 2002.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D.V. Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1445-1452, 2017

ROSA, A.C.; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 170, p. 38-45, 2013.

ROSAS, E.L.; CORREA, L.B.; PÁDUA, T.A.; COSTA, T.E.M.M; MAZZEI, J.L.; HERINGER, A.P.; BIZARRO, C.A.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 175, n. 490–498, 2015.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; DE LA ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, v. 48, p. 601–606, 2003.

ROTHAUG, M.; BECKER-PAULY, C.; ROSE-JOHN, S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1863, p. 1218–1227, 2016.

SÁ, I. M.; ELISABETSKY, A. N. E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 142, p. 762–768, 2012.

SADIK, C.D.; KIM, N.D.; LUSTER, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, v. 32, n.10, p. 452–460, 2012.

SALARITABAR, ALI.; DARVISHI, B.; HADJIAKHOONDI, F.; MANAYI, A.; SUREDA, A.; NABAVI, S.F.; FITZPATRICK, L.R.; NABAVI, S.M.; BISHAYEE, A. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World Journal of Gastroenterology*, v. 28, n. 23, p. 5097-5114, 2017.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology*, v.9, n.9, p. 949-952, 2008.

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiological Reviews*, v. 89, p. 707–758, 2009.

SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain beyond prostaglandins and cytokines. *Arthritis Research and Therapy*, v.13, n. 2, p. 2-10, 2011.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p. 878–888, 2011.

SCOTT, A.; KHAN, K.M.; COOK, J.L.; DURONIO, V. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? *British Journal of Sports Medicine*, v. 38, p. 248–249, 2004.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicology Pathology*, v. 54, p. 313-318, 2003.

SELVARAJ, G.; KALIAMURTHI, S.; THIRUNGNASAMBANDAM, R.; VIVEKANANDAN, L.; THANGAVEL, B. Anti-Nociceptive Effect in Mice of Thillai Flavonoid Rutin. *Biomedical Environment Science*, v. 27, n. 4, p. 295-299, 2014.

SERAINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Antioxidants and the immune system flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 69, p. 273–278, 2010.

SHARMA, S.; ALI, A.; ALI, J.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opinion in Investigational Drugs*, v. 22, n. 8, 17p., 2013.

SHEN, S-C.; LEE, W-R.; LIN, H-Y.; HUANG, H.C.; KO, C-H.; YANG, L-L.; CHEN, Y-C. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, v. 446, p.187-194, 2002.

SHERWOOD, J.C.; BERTRAND, J.; ELDRIDGE, S.E.; DELL’ACCIO, F. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 8, p. 1172-1177, 2014.

SHUKLA, M.; GUPTA, K.; RASHEED, Z.; KHAN, K.A.; HAQQI, T.M. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE₂ production in human chondrocytes in vitro. *Journal of Inflammation*, v. 5, n. 9, 10 p., 2008.

SILVA JUNIOR, F.S.; ROCHA, F.A.C. Artrite induzida por zymosan em ratos- mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. *Acta Reumatológica Portuguesa*, v. 31, p. 143-149, 2006.

SILVA, I.C. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 7, p. 35-46, 2015.

SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.G.L.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Revista Brasileira de Farmcologia*, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2007.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. *Infarma*, v.16, nº 13-14, 2005.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. *Biometry: The principles and Practice of Statistics*. New York: W. H. Freeman, 1981. p. 859.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine*, v. 15, n. 6-7, p. 462-469, 2008.

SOUZA, J.R.M.; OLIVEIRA, R.T.; BLOTTA, M.H.S.L.; COELHO, O.R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*; v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

SOWEMIMOA, A.; OKWUCHUKUA, E.; SAMUEL, F.M.; AYOOOLAA, O.; MUTIAT. I. Musanga cecropioides leaf extract exhibits anti-inflammatory and antinociceptive activities in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 506–512, 2015.

SULAIMAN, M.R.; ZAKARIA, Z.A.; CHIONG, H.S.; LAI, S.K.; ISRAF, D.A.; TG AZAM SHAH, T.M. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae) in Experimental Animal Models. *Medical Principles and Practice*, v.18, p. 272–279, 2009.

SUN, C-L.; WEI, J.; BI, L-Q. Rutin attenuates oxidative stress and proinflammatory cytokine level in adjuvant induced rheumatoid arthritis via inhibition of NF-κB. *Pharmacology*, v.100, p. 40–49, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 4ª Edição. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

TAK, P.P. Chemokine inhibition in inflammatory arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 20, n. 5, p. 929-939, 2006.

TANAE, M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*, v. 14, p. 309–313, 2007.

TAYLOR, P.C.; WILLIAMS, R.O.; FELDMANN, M. Tumour necrosis factor as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 557–563, 2004.

TOLEDO, V.M.; TELLEZ, M.G.O.; ORTIBRÁN, A.N.C.; ANDRADE-CETTO, A.; ARNAIZ, R.R. Genotoxicity testing of *Cecropia obtusifolia* extracts in two in vivo assays:

The wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila* and the human cytokinesis-block micronucleus test. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 58–63, 2008.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*; v. 48, p. 421-427, 1992.

TORRES-RÊGO, M.; FURTADO, A. A.; BITENCOURT, M. A.; DE SOUZA LIMA, M. C.; DE ANDRADE, R. C.; DE AZEVEDO, E. P.; SOARES, T.C.; TOMAZ, J.C.; LOPES, N.P.; SILVA JÚNIOR, A.A.; ZUCOLOTTO, S.M.; PEDROSA, M.F.F. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.16, p.275, 2016.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology and Therapy*, v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008.

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

UMAR, S.; MISHRA, N.K.; PAL, K.; SAJAD, M.; NEHA, M.S.; AHMAD, M.A.S.; KATIYAR, C.K.K.; KHAN, H.A. Protective effect of rutin in attenuation of collagen-induced arthritis in Wistar rat by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Indian Journal of Rheumatology*, v.7, n. 4, p. 191-198, 2012.

VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Medicina Experimentalis*. v. 11, p. 51-58. 1964.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citokines: a review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*;v. 24, n.4,p.146-154, 2001.

VENKATESHA, S.H.; BERMAN, B.M.; MOUDGIL, K.D. Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 21–29, 2011.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A.S. Nociception and role of immune system in pain. *Acta Neurollogica Belgica*, v. 115, p. 213–220, 2015.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, S.V.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v.29, n.2, 2006.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*, v. 12, n. 60, 20 p., 2015.

WANG, T-Y.; LI, Q.; BI, K-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, v. 13, p. 12-23, 2018.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, v. 2, p. 251-286, 2015.

WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B.; YIRMIYA, R.; SHAVIT, Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 22, p. 1072–1077, 2008.

WU, J.; MAOQIANG, L.; FAN, HE.; ZHENYU, B.; QIFANG, H., XUEPENG, W.; LIULONG, Z. Rutin attenuates neuroinflammation in spinal cord injury rats. *Journal of Surgical Research*, v. 203, p. 331-337, 2016.

XUA, P-X.; WANGA, S-W.; YUA, X-L.; SUA, Y-L.; WANGA, T.; ZHOUA, W-W.; ZHANGA, H.; WANG, Y-J.; LIUA, R-T. Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing A oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation. *Behavioural Brain Research*, v. 264, p. 173–180, 2014.

YIN, Z-Y.; LI, L.; CHU, S-S.; SUN, Q.; MA, Z-L.; GU, X.P. Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. *Scientific Reports*, v.7, 9 p., 2016.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*, v. 16, n. 1, p. 31–42, 2009.

ZHANG, J-M.; NA, J. Cytokines, chemokines, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHANG, R-X.; RENZ, K.; DUBNER, R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models, *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 21, n. 1308-1315, 2013.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement*, v. 554, p. 221-233, 1986.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.