

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA
DO EXTRATO METANÓLICO DE ADIANTUM LATIFOLIUM
LAM. EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR
INFLAMATÓRIA**

TÂMARA MAGALHÃES OLIVEIRA NOGUEIRA

**Salvador – Bahia – Brasil
2010**

Tâmara Magalhães Oliveira Nogueira

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO
EXTRATO METANÓLICO DE ADIANTUM LATIFOLIUM LAM.
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Cristiane Flora Villarreal

Salvador – Bahia – Brasil

2010

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N778a Nogueira, Tâmara Magalhães Oliveira.
Caracterização da atividade antinociceptiva do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* Lam. em modelos experimentais de dor inflamatória [manuscrito] / Tâmara Magalhães Oliveria Nogueira. – 2010.
66 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, 2010.

Orientador: Profa. Cristiane Flora Villarreal.

1. Adiantum. 2. Samambaias. 3. Antinocicepção. 4. Dor inflamatória. 5. Interleucina-1beta
I. Título

CDU 635.917:616.8-009.7

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais queridos, Valmari e
Iris, pelo apoio, incentivo e abdições
em prol da minha formação...*

*....e aos meus irmãos, Thamires e Júnior,
pela certeza de serem meu porto-seguro.
Vocês são essenciais em minha vida....*

AGRADECIMENTOS

"NINGUÉM É TÃO ALGUÉM, QUE NUNCA PRECISOU DE NINGUÉM"

É muito bom terminar mais uma etapa em nossas vidas. A sensação de dever cumprido é inexplicável, mas já vejo novos horizontes pela frente, pois meus objetivos vão além das páginas seguintes. O mestrado me ensinou muito, mas a maior dentre as lições é a de que ninguém faz nada sozinho. Portanto tenho muito a agradecer:

À professora Cristiane Flora Villarreal, minha orientadora, a quem devo a oportunidade de conclusão do meu mestrado, por ter aceitado me orientar num período de transição muito difícil para mim. Agradecer também por ser um exemplo de orientadora, sempre gentil e comprometida na formação de recursos humanos. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão...

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, por ter me aceitado no LETI, laboratório no qual é chefe, sem mesmo me conhecer. Obrigada pela confiança.

À Dra. Simone Macambira, pelo exemplo de pessoa e profissional, por tratar a mim a todos sempre com doçura e pela convivência agradabilíssima no laboratório.

Ao Dr. Alberto Noronha Dutra, por ter me iniciado na pesquisa e pelas conversas, sobre todos os assuntos do mundo, sempre prazerosas!

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, por ter me aceitado no seu laboratório quando entrei no CPqGM, pelo exemplo de ser humano e profissional.

À Fabiana Regina Nonato, a "tia Fabi", pela parceria e por toda ajuda com os experimentos, pela presteza de sempre e pelas palavras de apoio e otimismo que me colocavam para cima dizendo que tudo ia dar sempre certo!

À Flávia Oliveira de Lima, pelas discussões em relação ao trabalho e pela amizade construída durante este período, sempre me dando muitos conselhos.

À Taís Adelita, pelas constantes discussões dos nossos trabalhos, que fizeram com que eu desenvolvesse mais meu senso crítico.

Aos colegas Vinícius Rocha e Gisele Leite pela grande ajuda com os experimentos finais, não hesitando em me ajudar nos horários e dias mais complicados.

Aos demais colegas do LETI pela companhia diária.

Ao amigo paulista David Garrido Andrade, pela amizade e por tornar os meus dias no CPqGM, e fora dele, muito mais animados!

Às colegas Viviane Junqueira e Luciana Aragão, por quem tenho muito carinho, pela amizade e pela companhia sempre agradável durante o meu tempo no LPBI.

Aos meus colegas mais próximos de mestrado: Lúcio Barbosa, Adenizar Chagas, Lorena Pinto e Thayna Meirelles, pelos bons momentos vividos ao longo desses dois anos.

À Yanairara Pinchemel e Alice Kiperstok pela amizade construída nesse tempo em que fomos colegas de mestrado. A amizade foi construída aqui, mas será para a vida inteira.

A Lucas Nogueira, pelo imenso apoio dado a mim no início do mestrado, sempre me dando conselhos.

A Yánnick Fonseca, por todo carinho, paciência e ajuda na elaboração desta dissertação.

À Roberta Couto e em especial, Lucyvera Imbroinise, a “Veroca”, pelo excelente trabalho na administração do LETI e pela convivência diária muito prazerosa.

Às bibliotecárias do centro, em especial Martha Silvia Martinez Silveira, pela ajuda na busca de artigos não acessíveis para mim e pela elaboração da ficha catalográfica desta dissertação.

Ao Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, em especial à secretária da coordenação de ensino, Taíse Coutinho Caires, pela presteza de sempre e pela competência e rapidez na solução dos problemas.

À FIOCRUZ, pelo apoio financeiro.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...

Que já têm a forma do nosso corpo ...

*E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares ...*

É o tempo da travessia ...

E se não ousarmos fazê-la ...

Teremos ficado ... para sempre ...

À margem de nós mesmos... "

Fernando Pessoa

RESUMO

Adiantum, um dos gêneros mais amplamente distribuídos da família Pteridaceae é empregado na medicina popular mundialmente. Neste trabalho, nós investigamos as propriedades antinociceptivas do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) em modelos animais de dor inflamatória. As propriedades farmacológicas de EMA foram avaliadas nos testes de contorção, formalina, retirada de cauda e nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido pelo ácido aracdônico. A toxicidade aguda de EMA, assim como seu efeito sobre o desempenho motor dos camundongos no teste de rota rod, foram investigados. Além disso, o perfil químico de EMA foi avaliado por cromatografia. A administração oral (100-400 mg/Kg) ou intraperitoneal (1-100 mg/Kg) de EMA produziu uma inibição dose-dependente do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Do mesmo modo, o tratamento com EMA (100 mg/Kg/IP) inibiu a hipernocicepção induzida pela formalina tanto na fase inicial quanto na fase tardia. Em contraste, EMA não alterou o limiar de resposta a estímulo térmico no teste de retirada de cauda, indicando ausência de ação central. Confirmando sua atividade antiinflamatória, EMA (100 e 200 mg/Kg/IP) inibiu eventos importantes relacionados à resposta inflamatória induzida pela carragenina ou ácido aracdônico: edema local e aumento nos níveis de interleucina-1 β tecidual. Camundongos tratados com EMA (200 mg/Kg) não mostraram alteração no desempenho motor no teste de rota rod, ou sinais de toxicidade (1000 mg/Kg) durante um período de 14 dias. A análise fitoquímica preliminar indicou a presença de terpenos, esteróides, flavonóides e ácidos fenólicos, os quais podem ser responsáveis pelos efeitos antinociceptivo e/ou antiinflamatório de EMA. Os extratos metanólicos de diferentes partes da planta apresentaram atividade antinociceptiva de igual magnitude, sugerindo que o princípio ativo de EMA se distribui por toda a planta. Quando as frações do extrato foram avaliadas, a butanólica e de acetato de etila apresentaram maior eficácia, sendo consideradas as frações mais ativas. Nossos resultados demonstram que *Adiantum latifolium* apresenta consistente atividade antinociceptiva e antiinflamatória em diferentes modelos experimentais, possivelmente pela inibição da produção e/ou liberação de IL-1 β , constituindo bom candidato para o desenvolvimento farmacológico.

Palavras-chave: *Adiantum* • samambaias • antinocicepção • dor inflamatória • interleucina-1 β

ABSTRACT

Adiantum, one of the most widely distributed genera of the Pteridaceae family, is employed in folk medicine worldwide. In the present study, we investigated the antinociceptive effects of the methanolic extract of *Adiantum latifolium* (MEA) in animal models of inflammatory pain. The pharmacological properties of MEA were evaluated by using writhing, formalin and tail flick tests, carrageenan-induced paw oedema and arachidonic acid-induced ear oedema models. Mice motor performance was evaluated in the rota-rod test and the acute toxicity evaluated over 14 days. In the next experiments series, the active part of *Adiantum latifolium*, as well as the active fraction of MEA, was evaluated. A phytochemical screening for classes of constituents of MEA was carried out by thin layer chromatography (TLC). Oral (100-400 mg/kg) or intraperitoneal (1-100 mg/kg) administration of MEA produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced writhing in mice. Furthermore, treatment with MEA (100 mg/kg/IP) inhibited both the early and late phases of formalin induced hypernociception. In contrast, MEA (100 mg/kg/IP) did not prevent the thermal nociception in the tail flick test. In addition, MEA (100 and 200 mg/kg/IP) inhibited important events related to the inflammatory response induced by carrageenan or arachidonic acid: namely local oedema and increase in tissue interleukin-1 β levels. MEA (200 mg/kg/IP) treated mice did not show any motor performance alterations. Over the study duration of 14 days, there were no deaths or toxic signs recorded in the group of mice given 1000 mg/kg of MEA. Phytochemical analysis indicated the presence of terpenes, steroids, flavonoids and phenolic acids, which may be responsible for the MEA antinociceptive and/or antiinflammatory effects. Methanolic extracts from different parts of *Adiantum latifolium* showed equivalent antinociceptive activity, suggesting that the active principle of EMA is homogeny distributed through the plant. Butanolic and ethyl acetate fractions were the more active fractions of MEA. Our results demonstrate that *Adiantum latifolium* presents significant antinociceptive and antiinflammatory activities in different experimental models, possibly through an inhibition of IL-1 β production and constitute good candidate for pharmacologic development.

Keywords: *Adiantum* • ferns • antinociception • inflammatory pain • interleukin-1 β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Adiantum latifolium</i>	27
Figura 2	Teste de contorção abdominal em camundongos	34
Figura 3	Teste da formalina em ratos	35
Figura 4	Teste de retirada de cauda em ratos	36
Figura 5	Teste de rota rod em camundongos	40
Figura 6	Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal ou oral do extrato metanólico de <i>Adiantum latifolium</i> (EMA) no modelo de contorções abdominais em camundongos	43
Figura 7	Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de <i>Adiantum latifolium</i> (EMA) na nocicepção induzida pela formalina em ratos	45
Figura 8	Efeitos antiinflamatório do extrato metanólico de <i>Adiantum latifolium</i> (EMA) na inflamação da pata induzida por carragenina	47
Figura 9	Efeitos antiinflamatórios do extrato metanólico de <i>Adiantum latifolium</i> (EMA) na inflamação da pata induzida por carragenina	48
Figura 10	Efeitos antiinflamatórios do extrato metanólico de <i>Adiantum latifolium</i> (EMA) na inflamação de orelha induzida pelo ácido aracdônico	49
Figura 11	Comparação da atividade antinociceptiva dos extratos metanólicos da folha, pecíolo e caule+raíz de <i>Adiantum latifolium</i>	50
Figura 12	Comparação da atividade antinociceptiva de diferentes frações do extrato de EMA	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito de EMA no teste de retirada de cauda em ratos	46
Tabela 2	Efeito de EMA sobre o desempenho motor dos camundongos no aparelho de rota rod	52

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina (quimicamente, 5-hidroxitriptamina)
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
AP1	Ativador de proteína -1
ATP	Adenosina Tri-fosfato (do inglês, <i>Adenosine triphosphate</i>)
CCD	Cromatografia em camada delgada
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
d	Dia (s)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
E.P.M.	Erro padrão da média
EMA	Extrato metanólico de <i>Adiantum</i>
g	Grama (s)
GC	Glicocorticóide
h	Hora (s)
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, <i>International Association of the Study of Pain</i>)
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IP	Via intraperitoneal
Ipl	Via intraplantar
KOH	Hidróxido de Potássio (do latim, <i>kallium</i>)
min	Minuto (s)

NFkB	Fator nuclear kB
NO	Óxido Nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido Nítrico Sintase (do inglês, <i>Nitric Oxide synthase</i>)
NP/PEG	Difenilborato de aminoetanol
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PO	Via oral (do latim, <i>Per os</i>)
RGC	Receptor de glicocorticoide citosólico
r.p.m.	Rotações por minuto
s	Segundos
SC	Via Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor- α</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mg/Kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL/kg	Mililitro por quilograma
pg/mL	Picograma por mililitro
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. DOR: ASPECTOS GERAIS	16
1.2. TIPOS DE DOR	18
1.3. DOR INFLAMATÓRIA	19
1.4. CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR INFLAMATÓRIA	21
1.5. PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	23
1.6. PTERIDÓFITAS	25
1.7. <i>ADIANTUM LATIFOLIUM</i>	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. MATERIAL VEGETAL	32
4.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES	32
4.3. ANÁLISE QUÍMICA	32
4.4. ANIMAIS	33
4.5. TESTES NOCICEPTIVOS	33
4.5.1. TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS	34
4.5.2. TESTE DA FORMALINA	35
4.5.3. DETERMINAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO: TESTE DE RETIRADA DE CAUDA	36
4.6. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	37
4.7. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARACDÔNICO	37
4.8. RETIRADA DE MATERIAL PARA DOSAGEM DE CITOCINAS	37
4.9. QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA-1 β	38
4.10. TOXICIDADE AGUDA	39
4.11. FUNÇÃO MOTORA: TESTE DE ROTA-ROD	39
4.12. DROGAS E ADMINISTRAÇÃO	40
4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS	42
5.1. EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE EMA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS	42

5.2.	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE EMA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA EM RATOS -----	44
5.3.	CONTRIBUIÇÃO DE MECANISMOS CENTRAIS PARA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE EMA -----	45
5.4.	ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE EMA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA -----	46
5.5.	ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE EMA EM MODELO DE EDEMA DE ORELHA -----	48
5.6.	ANÁLISE QUÍMICA -----	49
5.7.	DETERMINAÇÃO DA PARTE DA PLANTA (<i>ADIANTUM LATIFOLIUM</i>) QUE CONTÉM A SUBSTÂNCIA BIOATIVA RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA -----	49
5.8.	DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO DE EMA QUE CONTÉM A(S) SUBSTÂNCIA(S) BIOATIVA(S) RESPONSÁVEL(IS) PELA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA -----	50
5.9.	AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE EMA NO DESEMPENHO MOTOR DOS CAMUNDONGOS -----	51
5.10.	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA -----	52
6.	DISCUSSÃO _____	53
7.	CONCLUSÕES _____	60
8.	REFERÊNCIAS _____	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor: aspectos gerais

“Para o Homem, a dor é um senhor mais terrível que a própria morte”. Esta frase do filósofo e médico alemão, Albert Schweitzer, retrata como a dor desde muito tempo é um dos grandes temores da humanidade.

A interpretação das dimensões da dor variou de acordo com cada sociedade e com o momento histórico em que esta se encontrava. Nos primórdios da humanidade, a dor era atribuída aos maus espíritos e às punições pelas falhas cometidas, por isso a medicina era frequentemente exercida por sacerdotes que acreditavam que as preces apresentavam efeitos terapêuticos (Teixeira and Okada 2001). O próprio termo em inglês *“pain”*, que deriva do latim *“poena”*, significa punição, pena, castigo.

Nos textos cuneiformes da Mesopotâmia, são encontradas referências de que o médico era encarregado de realizar exorcismos para aliviar a dor, considerada castigo divino. Para isso, fazia orações e utilizava folhas de mirto, sabido atualmente ter propriedades analgésicas, pois contêm precursores do ácido acetilsalicílico (Dias 2009). Similarmente, os egípcios acreditavam que a causa da dor estava na punição dos deuses ou dos espíritos. Na Índia, a dor era descrita como uma frustração dos deuses e, portanto, localizavam-na na alma (Dias 2009). Contudo, foi somente a partir do final da Idade Média que a concepção espiritual e religiosa da dor foi suplantada pelo aspecto sensorial, que passou a ser evidenciado com os avanços no conhecimento científico e da anatomia humana (Teixeira e Figueiró; Bonica 2010).

Independente dos diferentes conceitos e interpretações ao longo do tempo, a dor sempre foi uma das grandes preocupações da humanidade e o interesse universal

pelo entendimento e controle da dor levou à fundação, em 1973, da *International Association for Study of Pain (IASP)*.

A IASP define a dor como sendo uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial. De fato, a dor é uma experiência que envolve não somente a transdução de estímulos nocivos, como também um processamento emocional pelo encéfalo (Julius e Basbaum 2001). Assim, o fenômeno doloroso é formado por dois componentes: um sensorial-discriminativo, que torna possível identificar aspectos como localização e intensidade do estímulo nocivo; e um componente afetivo-motivacional, que atribui emoção à experiência dolorosa – sofrimento, medo, ansiedade – sendo, então, responsável pelas respostas comportamentais à dor (Basbaum e Woolf 1999; Calvino e Grilo 2006; Pedersen, Scheel-Kruger et al. 2007).

O primeiro componente, o sensorial, está associado ao mecanismo pelo qual a informação de dor, seja ela provocada por lesão real ou potencial, chega ao sistema nervoso central (SNC). Este processo é chamado de nocicepção. O segundo componente, o afetivo, está associado a comportamentos de memória, aprendizagem e o significado simbólico dado ao fenômeno sensitivo (Vitor 2008). Dessa forma, vale ressaltar que nocicepção e dor não são sinônimos. A dor é sempre subjetiva, é o resultado subjetivo da nocicepção, e cada indivíduo interpreta a dor em função de suas experiências. Portanto, o termo nocicepção é mais adequado para condições experimentais, já que a identificação da dor em animais não é óbvia.

A dor é o principal sintoma de uma série de doenças. Ela é frequentemente incapacitante e reduz a qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo,

sendo uma das razões mais comuns de procura por serviços médicos (Kipel 2004). Apesar de não existirem estatísticas exatas de estudos epidemiológicos, dados de fontes variadas sugerem que anualmente nos Estados Unidos e em outros países industrializados, 15 a 20% da população sofrem de dor aguda e 25 a 30%, de dor crônica (Bonica 2010). A dor aguda é registrada como o sintoma apresentado em mais de 80% das visitas médicas e a dor crônica afeta aproximadamente 76,2 milhões de americanos – mais do que diabetes, doenças cardíacas e câncer juntos (Walid, Donahue *et al.* 2008). A dor crônica é um problema de saúde pública que causa morbidade, faltas no trabalho e incapacidade temporária ou permanente, gerando altos custos aos sistemas de saúde. Pesquisa feita com a população de Salvador apontou que 41,4% dos indivíduos sofrem de dor crônica, colocando o Brasil entre os países de mais alta prevalência (Sa, Baptista *et al.* 2009).

1.2. Tipos de dor

Existem duas principais manifestações de dor. A dor fisiológica, que acontece quando um estímulo nocivo é aplicado num tecido intacto. Esse tipo de dor tem uma função fisiológica nítida, ou seja, proteger o tecido contra a lesão, pois ativa reflexos de proteção, como o reflexo de retirada. Sendo assim, é um mecanismo fisiológico, atuando como um sistema de alarme que notifica o corpo da presença de algum perigo ou estímulo nocivo do ambiente (Basbaum e Woolf 1999; Schaible e Richter 2004).

Uma condição diferente é a dor fisiopatológica, que pode ser aguda ou crônica. A dor aguda geralmente ocorre quando o tecido está inflamado ou lesado. Nessas condições, pode ocorrer dor na ausência de qualquer estímulo intencional (dor espontânea), resposta de dor aumentada a estímulo nocivo (hiperalgesia) e resposta

de dor a estímulo inócuo (alodinia) (Schaible e Richter 2004). A dor aguda também tem função protetora, pois propicia o reparo do tecido pela criação de uma região de hipersensibilidade localizada nos arredores da parte lesada, que minimiza o movimento e o contato com a lesão até que a cura ocorra (Basbaum e Woolf 1999). Já a dor crônica é aquela que persiste mesmo tendo passado a fase de cura de uma lesão ou injúria, passando a se repetir ou sustentar-se por período prolongado e não tem aparentemente nenhuma função fisiológica ou protetora (Apkarian, Baliki *et al.* 2009). Ela pode ser associada com inflamação crônica, na qual o dano tecidual é óbvio, mas também existem condições nas quais nenhuma causa aparente pode ser encontrada.

Até o momento, os mecanismos que levam à cronificação da dor ainda são pobremente entendidos, mas ela é geralmente associada a modificações na expressão gênica, sensibilidade neuroquímica e alterações duradouras no sistema nervoso (Dray 1995).

1.3. Dor inflamatória

A dor inflamatória é um sintoma comum de muitas doenças distintas, sendo caracterizada por hiperalgesia e alodinia, devido à sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários (Cunha, Verri *et al.* 2005). Essas fibras, num tecido normal, têm alto limiar de ativação, portanto, estímulos de grande intensidade são necessários para excitá-las (Schaible e Richter 2004). Após uma lesão tecidual ou inflamação, os nociceptores (terminações nervosas livres das fibras aferentes primárias nociceptivas) são sensibilizados de tal maneira, que a aplicação de um estímulo que inicialmente era leve ou mesmo inofensivo, passa a ser capaz de ativar a fibra nociceptiva, tornando-se doloroso (Verri, Cunha *et al.* 2006). Além disso, o

processo inflamatório ainda é capaz de recrutar nociceptores silenciosos, não excitáveis em tecidos normais, mas que durante a inflamação são sensibilizados, tornando-se responsivos a estímulos posteriores (Schaible e Richter 2004).

A sensibilização nociceptiva durante a inflamação é evocada pela ação de mediadores químicos nos nociceptores. Uma variedade de substâncias é liberada pelo estímulo inflamatório, enquanto outras são sintetizadas durante os eventos que seguem a inflamação (Dray 1995). Por exemplo, a lesão tecidual inicial resulta na liberação de mediadores pelas células lesadas, incluindo os prótons H^+ e K^+ , serotonina (5-HT), bradicinina, histamina, adenosina tri-fosfato (ATP) e óxido nítrico (NO). Posteriormente, a ativação do processo inflamatório induz a via do ácido aracônico, resultando na produção de prostaglandinas e leucotrienos e, por fim, as células do sistema imune são recrutadas liberando ainda outros mediadores, incluindo fatores de crescimento e citocinas como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Kidd e Urban 2001).

Tais mediadores inflamatórios interagem com receptores específicos nos nociceptores. Alguns deles, como H^+ , ATP e 5-HT são capazes de ativar diretamente os nociceptores causando dor, enquanto outros não ativam diretamente, mas contribuem para o processo de sensibilização nociceptiva, reduzindo o limiar de ativação e facilitando a geração do potencial de ação (Basbaum e Woolf 1999). Esses mediadores ainda ativam cascatas de segundos mensageiros, influenciando canais iônicos, enzimas e proteínas de sinalização intracelular nos nociceptores. Tal processo leva ao aumento da excitabilidade do neurônio, diminui o limiar de ativação e aumenta a frequência de potenciais de ação produzidos durante uma estimulação supralimiar (Schaible e Richter 2004).

Quando a dor inflamatória decorre de processos transitórios, seu impacto social é relativamente pequeno. Entretanto, ela é muitas vezes associada a doenças crônicas de difícil tratamento, podendo persistir por anos, passando a ser fonte de sofrimento para o indivíduo (Dubner e Ruda 1992).

1.4. Controle farmacológico da dor inflamatória

Drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) representam a classe de fármacos mais utilizada no controle da dor inflamatória. Esses fármacos são atualmente as medicações mais prescritas do mundo, apresentando amplo espectro de indicações terapêuticas. Na Europa, os AINEs representam mais do que 7,7% do total de prescrições médicas (Sostres, Gargallo *et al.* 2009) e, somente nos Estados Unidos, foram emitidas 111 milhões de prescrições no período de 1999 a 2000 (Lanas e Ferrandez 2006).

Apesar de sua eficácia em uma ampla gama de condições de dor e inflamação, a administração de AINES em longo prazo pode induzir o aparecimento de úlceras gastrointestinais, sangramentos e desordens renais devido à inibição não seletiva das isoformas constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2) da enzima ciclooxigenase (COX) (Robert 1976; Peskar 1977; Tapiero, Ba *et al.* 2002). A COX é a enzima responsável pela metabolização do ácido aracdônico em precursores das prostaglandinas. Estes são depois processados em prostaglandinas biologicamente ativas, sendo a prostaglandina E₂ (PGE₂) a mais relevante para a indução da dor inflamatória (Chopade e Mulla 2010).

As prostaglandinas participam de processos patológicos, como a sensibilização direta de nociceptores, facilitando a hiperalgesia inflamatória, mas também de processos fisiológicos como a proteção da mucosa gástrica (Goodman e Gilman

2005). Durante muito tempo, os efeitos colaterais dos AINEs foram associados à inibição das funções fisiológicas das prostaglandinas em consequência da inibição da COX-1.

Por outro lado, o desenvolvimento de inibidores COX-2 seletivos, mostrou que nem todos os efeitos indesejados dos AINEs podem ser associados à inibição da COX-1. Os coxibes, inibidores seletivos de COX-2, apesar da reduzida toxicidade gastrointestinal, têm sido associados a efeitos cardiovasculares adversos, como aumento da ocorrência de infarto do miocárdio e acidentes vasculares encefálicos (Dogne, Supuran *et al.* 2005).

Outra classe de fármacos utilizada no controle da dor inflamatória é a dos glicocorticóides (GC). Esta classe possui um amplo espectro de indicações terapêuticas, porém tem seu papel central no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos inflamatórios e ativação do sistema imunológico, sendo como fármacos antiinflamatórios a sua principal indicação (Longui 2007).

A maioria dos efeitos antiinflamatórios dos glicocorticóides é mediada via receptores de glicocorticóides citosólicos (RGC), que são encontrados em cada célula do corpo e exercem uma variedade de ações fisiológicas afetando cada sistema do organismo (Kim, Brar *et al.* 2009).

O complexo GC/RGC regula tanto positiva quanto negativamente a síntese de certas proteínas agindo de duas maneiras: o complexo é translocado para o núcleo celular, atuando como fator de transcrição para genes específicos por meio de sua ligação ao DNA, podendo estimular ou inibir a expressão desses genes; ou pela ligação direta ou indireta com fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NFkB) e o ativador de proteína-1 (AP1), interferindo negativamente em suas funções (Longui 2007; Kim, Brar *et al.* 2009; Spies, Bijlsma *et al.* 2010).

Dessa forma, os glicocorticóides regulam, por exemplo, a síntese de proteínas pró-inflamatórias tais como COX-2, óxido nítrico sintase (NOS), moléculas de adesão, TNF- α , IL-1, interleucina-6 (IL-6), entre outras.

Apesar dos efeitos terapêuticos proeminentes, a utilização prolongada de glicocorticóides leva a efeitos adversos frequentes em função da interferência com atividades metabólicas, entre eles: suscetibilidade à infecção, alteração da distribuição de gordura corporal, hiperglicemia, hipertensão arterial, glicosúria, osteoporose, interrupção do crescimento (em crianças), irritação gástrica, dentre inúmeros outros (Goodman e Gilman 2005).

Devido aos diversos efeitos colaterais atribuídos aos analgésicos/antiinflamatórios atualmente disponíveis e sua reduzida eficácia em alguns estados de dor, o adequado controle da dor inflamatória ainda permanece um grande desafio. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o manejo da dor inflamatória, com maior seletividade e eficácia, além de menos efeitos colaterais, torna-se prioritário (Chopade e Mulla 2010).

1.5. Produtos naturais como fonte de medicamentos

Os produtos naturais representam fonte promissora de obtenção de novas moléculas com atividade farmacológica e potencial para o desenvolvimento farmacêutico.

O uso popular de plantas medicinais para o tratamento de doenças acompanha o Homem desde os primórdios da civilização (Calixto, Beirith *et al.* 2000) e, ao longo dos anos, os produtos naturais contribuíram enormemente para o desenvolvimento de importantes drogas utilizadas na medicina moderna (Cragg, Newman *et al.* 1997; De Souza, Pereira *et al.* 2009). Prova disso é que atualmente cerca de 30% dos

fármacos existentes no mercado são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, sejam eles plantas, animais ou microorganismos (Calixto 2005).

Dentre as drogas importantes que estão no mercado e que são obtidas a partir de produtos naturais destacam-se a morfina, a pilocarpina, a digitalina, a atropina, o captopril, a escopolamina e muitas outras (Calixto, Scheidt *et al.* 2001). Em alguns casos, como no desenvolvimento de drogas antitumorais e antimicrobianas, aproximadamente 60% dos medicamentos disponíveis atualmente no mercado, e a maior parte daqueles que estão em testes finais de ensaios clínicos, são derivados de produtos naturais (Cragg, Newman *et al.* 1997).

A investigação de produtos naturais como fonte de novas drogas alcançou seu pico na indústria farmacêutica ocidental nas décadas de 70-80, quando resultou num cenário farmacêutico fortemente influenciado por moléculas não sintéticas (Koehn and Carter 2005). Entretanto, nas últimas décadas, devido em grande parte ao avanço da química combinatória, a pesquisa em produtos naturais na indústria farmacêutica experimentou um lento declínio (Calixto 2005; Koehn and Carter 2005).

Por outro lado, as plantas ainda têm uma importante contribuição no cuidado com a saúde (Calixto 2000). Tal aspecto pode ser comprovado pelo fato de que, ainda hoje, até 80% da população dos países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais para o cuidado primário com a saúde devido à baixa renda e à falta de acesso aos medicamentos modernos (Calixto 2000). Particularmente no Brasil, o comércio de medicamentos atende apenas à faixa da população economicamente ativa (cerca de 30%), supondo-se que os restantes 130 milhões de habitantes utilizem produtos de venda não registrada (Simões, Schenkel *et al.* 2003). Por outro lado, até mesmo em países desenvolvidos como Alemanha,

França, Itália, Estados Unidos e, sobretudo em países asiáticos, as preparações de plantas medicinais são muito populares (Calixto 2000).

Uma grande vantagem da utilização dos produtos naturais como fontes de novos fármacos é que embora muitos compostos derivados de plantas medicinais possam ser sintetizados em laboratório farmacêutico, tal síntese é freqüentemente tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção é economicamente inviável. (Simões, Schenkel *et al.* 2003). Essa realidade tem feito ressurgir o interesse, não só no meio acadêmico, mas na indústria farmacêutica, por substâncias com atividades farmacológicas oriundas de produtos naturais.

Apesar do potencial dos produtos naturais como fonte de moléculas bioativas, a biodiversidade é ainda pouco explorada, já que menos de 10% das espécies de plantas existentes no planeta (250.000-300.000) têm sido estudadas em relação aos aspectos biológicos, químicos e farmacológicos (De Souza, Pereira *et al.* 2009). O Brasil está dentro desse quadro: sozinho possui cerca de 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes, porém relativamente poucas espécies de plantas têm sido objeto de alguma investigação científica (Calixto 2005).

1.6. Pteridófitas

Dentre as plantas com potencial terapêutico destacam-se as pteridófitas, consideradas boas fontes de fitofármacos desde a antiguidade. Espécies como *Dryopteris filix-mas* L. (o feto-macho) e *Pteridium aquilinum* L. (a samambaia das taperas), são reconhecidas de longas datas como poderosos vermífugos, fazendo parte da medicina oficial de diversos países da Europa (Barros and Andrade 1997). A samambaia *Pleopeltis macrocarpa* é conhecida pelas suas propriedades antiofídicas e ansiolíticas, enquanto a *Selaginella asperula* é muito utilizada

popularmente como cicatrizante (Barros and Andrade 1997). Com a observação de que as pteridófitas não são infectadas por patógenos microbianos – um dos fatores importantes para seu sucesso evolucionário, tendo sobrevivido por mais de 350 milhões de anos – atualmente diversas pteridófitas são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças infecciosas (Singh, Singh *et al.* 2008). Por exemplo, espécies como *Asplenium serratum* L. (feto macho do Pará), *Blechnum Occidentale* L., *Trichipteris microdonta* (samambaiçu) e *Adiantum serrato-dentatum* (quebra-pedra) são samambaias com propriedades antiinfecciosas bastante utilizadas na medicina popular brasileira (Barros and Andrade 1997). Entretanto, apesar da riqueza da biodiversidade do país, poucos trabalhos científicos sobre as propriedades farmacológicas das pteridófitas brasileiras têm sido relatados.

Adiantum é um dos gêneros mais amplamente distribuídos da família Pteridaceae, compreendendo aproximadamente 150 espécies e é representado pelas plantas chamadas de “avenca” no Brasil (Melos, Silva *et al.* 2007). Estudos recentes demonstraram que algumas espécies desse gênero apresentam propriedades farmacológicas relevantes. Singh e colaboradores (2008) testaram diversas espécies de *Adiantum* em culturas de bactérias e fungos, confirmando atividade antimicrobiana, sustentando o uso etnobotânico e tradicional dessas espécies. Similarmente, Lopez e colaboradores (2001), demonstraram que os extratos de *Adiantum latifolium* apresentam atividade antiviral e antimicrobiana de amplo espectro.

A atividade antinociceptiva das pteridófitas também tem sido descrita. Trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato metanólico de *Blechnum occidentale* L., uma samambaia terrestre bastante utilizada na medicina popular (Nonato, Barros *et al.* 2009). Yonathan e

colaboradores (2006) evidenciaram atividade antinociceptiva e antiinflamatória de outra pteridófita, *Cheilanthes farinosa*, uma samambaia utilizada em muitas partes da Etiópia para tratar desordens inflamatórias de pele. Recentemente, Bresciani e colaboradores (2003) demonstraram atividade antinociceptiva de *Adiantum cuneatum* em modelos experimentais, justificando o uso popular dessa planta no tratamento de processos dolorosos. Esse mesmo grupo demonstrou, ainda, que o filiceno, um triterpeno isolado das folhas de *Adiantum cuneatum*, apresenta atividade antinociceptiva em diversos modelos animais de dor (De Souza, Pereira *et al.* 2009).

1.7. *Adiantum latifolium*

Adiantum latifolium é uma samambaia terrestre bem distribuída nas Américas Tropicais, abrangendo desde o México até a América do Sul, incluindo América Central, Antilhas, Colômbia, Venezuela, Guianas, Equador, Peru, Bolívia, Brasil e Paraguai (Moran and Yatskievych 1995). Esta samambaia apresenta caule delgado e rastejante, suas folhas têm de 30 a 70 cm de comprimento com lâminas foliares deltóides a deltóides-ovaladas, sendo bipinadas (Tryon and Stolze 1989), conforme figura 1.



Figura 1 - *Adiantum latifolium*
Fonte: acervo pessoal

Apesar da ampla distribuição e potencial fonte de substâncias bioativas, até o presente momento pouquíssimos estudos da atividade farmacológica de *Adiantum latifolium* foram realizados. Baseado na informação de que outra espécie do gênero *Adiantum* tem atividade antinociceptiva, no presente trabalho nós investigamos e caracterizamos farmacologicamente a atividade antinociceptiva de *Adiantum latifolium* em diferentes modelos experimentais de dor inflamatória.

A escolha da espécie *Adiantum latifolium* como objeto de estudo foi feita utilizando-se a estratégia quimiotaxonômica, segundo a qual são avaliadas espécies taxonomicamente próximas de uma cuja atividade já foi detectada (Gottlieb and Borin 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A biodiversidade brasileira é fonte inestimável de recursos naturais para obtenção de medicamentos. Contudo, nossas espécies nativas têm sido pouco estudadas quanto ao potencial farmacológico. Segundo a Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica, a arrecadação nacional do setor ultrapassou 19 milhões de reais no período de janeiro a agosto de 2009. Nos EUA, o investimento em pesquisa e desenvolvimento pela Indústria Farmacêutica é superior a 20% do faturamento, o que representa muitos bilhões de dólares/ano. Da mesma forma, a indústria farmacêutica brasileira tem investido cada vez mais em pesquisa visando o desenvolvimento de novos medicamentos.

O desenvolvimento de fármacos a partir de substâncias naturais encontradas na biodiversidade, muitas vezes de grande potencial biológico e alta complexidade estrutural, pode representar uma enorme redução de custos de produção já que a busca de moléculas ativas com estruturas moleculares complexas é difícil de ser feita por processos sintéticos a um custo racional. De acordo com essa idéia, estudos pré-clínicos de caracterização farmacológica de substâncias bioativas representam etapa fundamental no desenvolvimento de medicamentos. Além disso, o aproveitamento da biodiversidade regional como fonte de matéria prima para a indústria, é ponto chave para o estímulo ao investimento e desenvolvimento sustentável da região.

Dor, uma sensação desagradável que vivenciamos em nossa rotina diária, é um mecanismo de alerta do organismo contra a injúria e o dano tecidual, tendo, portanto função fisiológica protetora. Entretanto, a dor inflamatória é muitas vezes associada a doenças crônicas de difícil tratamento podendo persistir por anos, passando a ser fonte de sofrimento para o indivíduo (Dubner e Ruda, 1992).

As principais classes de fármacos atualmente disponíveis para o controle da dor inflamatória são associadas a efeitos indesejados severos, sobretudo mediante o uso prolongado. Essa situação torna patente a necessidade de desenvolvimento de novos analgésicos, com reduzidos efeitos indesejados e efetivos no controle da dor inflamatória.

No presente trabalho, investigamos as propriedades antinociceptivas de *Adiantum latifolium* em modelos animais de dor inflamatória, visando novas opções terapêuticas para o controle farmacológico da dor. A alta incidência de efeitos indesejados dos analgésicos disponíveis, sua baixa eficácia em alguns tipos de dor e, sobretudo, a necessidade de explorar o potencial farmacológico da biodiversidade brasileira, justificam a relevância desta dissertação.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Caracterizar a atividade farmacológica do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) em modelos experimentais de dor inflamatória e inflamação

3.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar a atividade antinociceptiva de EMA em modelos animais de dor inflamatória
- Verificar a contribuição de mecanismos centrais para o efeito antinociceptivo de EMA
- Avaliar a possível interferência de EMA com a função motora dos animais
- Avaliar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva de EMA: avaliação de atividade antiinflamatória e modulação da produção de citocinas
- Avaliar a toxicidade aguda de EMA
- Verificar em qual parte da planta se encontra(m) a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade antinociceptiva demonstrada
- Determinar a(s) fração(s) de EMA que contém a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade antinociceptiva demonstrada
- Avaliar o perfil químico de EMA por meio de caracterização fitoquímica preliminar

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Adiantum latifolium foi coletada numa região de Mata Atlântica em Salvador-Bahia-Brasil em agosto de 2006 em áreas autorizadas pelo IBAMA. Os espécimes receberam identificação botânica por Dra. Fabiana Regina Nonato (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM). Um exemplar da espécie foi depositado no Hérbario da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS 142949).

4.2. Preparação do extrato e das frações

As lâminas foliares (28,06 g), os pecíolos (14,36 g) e o caule+raiz (22,72 g), secos ao ar e pulverizados, foram exaustivamente extraídos com metanol. Os extratos obtidos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, resultando no extrato metanólico bruto (3,5 g, 0,83 g e 1,26 g, respectivamente). O extrato metanólico das lâminas foliares foi fracionado por partição líquido/líquido entre MeOH/H₂O 9:1 e hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, rendendo as frações hexânica (0,82 g), em diclorometano (0,38 g), em acetato de etila (0,54 g) e butanólica (1,13 g). Os estudos de caracterização de atividade antinociceptiva e antiinflamatória foram realizados com o extrato metanólico das lâminas foliares de EMA.

4.3. Análise química

Um *screening* fitoquímico para classes de constituintes do extrato foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica Macherey-Nagel pré-revestida em placas de alumínio de 200 µm de espessura com indicador fluorescente UV254. Uma alíquota (4 µL) de EMA (38 mg/mL) foi colocada na placa de CCD a qual foi desenvolvida com uma mistura de dois solventes: hexano/acetato

de etila (80:20, v/v) e acetato de etila/metanol/água/ácido acético (100:13:10:5, v/v). O perfil cromatográfico do extrato foi visualizado por reagentes em spray de acordo com metodologia descrita previamente (Wagner and Bladt 1994). Os reagentes em spray empregados incluíram anisaldeído-ácido sulfúrico, Liebermann-Burchard, NP/PEG, KOH/ethanol e solução de Dragendorff.

4.4. Animais

Os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM (protocolo L-IGM-012/09) antes do início do trabalho com os animais. As espécies utilizadas foram camundongos da linhagem Swiss Webster com peso entre 20-25 gramas, machos, e ratos Wistar com peso entre 180-200 gramas, machos, fornecidos pelo biotério do CPqGM. Os animais foram mantidos sob condições-padrão com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de 22 ± 2 °C e sem restrição hídrica ou alimentar. Os testes comportamentais foram realizados entre 8 e 17 horas. Os animais foram manipulados conforme os preceitos éticos para pesquisa com animais e diretrizes para investigação de dor experimental, determinados pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (Zimmermann 1983).

4.5. Testes nociceptivos:

Neste estudo, foi utilizado o termo hipernocicepção, ao invés de hiperalgesia ou alodinia, para definir a diminuição do limiar nociceptivo, já que a percepção de dor em animais não é óbvia.

4.5.1. Teste de contorções abdominais

As doses antinociceptivas de EMA por via oral e intraperitoneal foram inicialmente determinadas no teste de contorções abdominais em camundongos. Ácido acético (0,8% v/v, 10 mL/Kg) foi injetado na cavidade peritoneal dos camundongos, os quais foram alocados em funis de vidro individuais (23,5 cm de diâmetro) durante o período experimental para observação. A intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada pela contagem do número total de contorções que ocorreram entre 0 e 30 minutos após a injeção do estímulo nociceptivo (Collier, Dinneen *et al.* 1968). A resposta de contorção abdominal consiste de uma contração do músculo abdominal juntamente com o estiramento das patas traseiras. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato, ou com a droga de referência, em relação aos animais tratados com veículo (grupo controle).



Figura 2 - teste de contorção abdominal em camundongos
Fonte: acervo pessoal

4.5.2. Teste da formalina

A atividade antinociceptiva de EMA foi avaliada no teste da formalina em ratos. Os ratos foram alocados em funis de vidro (23,5 cm de diâmetro) por 30 minutos para ambientação e depois removidos para a administração intraplantar de formalina. Os animais foram gentilmente contidos enquanto se administrava 50 μ L de formalina 1% (diluição 1:100 da solução estoque de formalina, 37% de formaldeído em salina 0,9%) no dorso da pata traseira direita. Após a injeção, os ratos retornaram para os funis de observação por um período de 60 minutos. Os animais foram observados de 0 a 10 minutos (fase inicial) e de 10 a 60 minutos (fase tardia) e o *score* de nocicepção foi determinado para cada fase pela contagem do número de *flinches* do membro injetado durante o período de observação (Dubuisson e Dennis 1977). A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número de *flinches* dos animais pré-tratados com o extrato, ou com a droga de referência, em relação aos animais tratados com veículo (grupo controle).



Figura 3 - Teste da formalina em ratos
Fonte: acervo pessoal

4.5.3. Determinação de limiar nociceptivo térmico: teste de retirada de cauda

O possível envolvimento de mecanismos centrais na atividade antinociceptiva de EMA foi avaliado em ratos no teste de retirada de cauda (D'Amour 1941). Cada animal foi colocado em tubos ventilados e a cauda (4 cm da extremidade) foi apoiada transversalmente sobre o cilindro do analgesímetro (Insight, Brazil) à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). O cilindro é conectado a uma fonte de corrente elétrica variável por potenciômetro que permite elevar a temperatura à razão de 9°C/segundo a partir da temperatura ambiente, atingindo temperatura nociva de até 80°C. A latência para o reflexo de retirada de cauda foi mensurada para cada animal antes do início dos experimentos (basal) e após a administração de EMA. Um tempo de corte de oito segundos foi estabelecido para minimizar a probabilidade de dano da pele.



Figura 4 – Teste de retirada de cauda em ratos
Fonte: acervo pessoal

4.6. Edema de pata induzido por carragenina

A contribuição de efeitos antiinflamatórios para a ação antinociceptiva de EMA foi investigada. Inicialmente, a atividade antiinflamatória foi avaliada pela capacidade de EMA de reduzir a formação do edema induzido por carragenina. O edema de pata foi induzido pela administração intraplantar (Ipl) de carragenina (200 μ g/25 μ L/pata) na pata traseira direita dos camundongos. O volume da pata foi medido com um pletismômetro (Ugo Basile, Comerio, Italy) antes (Vb, basal) e 2, 4, 24 e 48 h após (Vf) a injeção, como descrito previamente (Winter, Risley *et al.* 1962). A mensuração do edema de pata foi determinada para cada camundongo e a diferença entre o valor final (Vf) e o valor basal (Vb) foi considerada o valor do edema.

4.7. Edema de orelha induzido por ácido aracdônico

A atividade antiinflamatória de EMA foi confirmada em um modelo de edema de orelha. O edema de orelha foi induzido pela injeção subcutânea de ácido aracdônico (2mg/20 μ L/orelha) na orelha direita dos camundongos. A espessura da orelha foi medida antes e após 1 hora da indução da inflamação (Young, Spires *et al.* 1984; Crummey, Harper *et al.* 1987) utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo 500-136 CD-6"). O paquímetro foi aplicado perto da extremidade da orelha e a espessura foi registrada em μ m. O edema foi expresso como o aumento da espessura da orelha em decorrência do desafio inflamatório.

4.8. Retirada de material para dosagem de citocinas

As amostras de orelha ou pele de pata foram obtidas 1 ou 3 horas após a injeção subcutânea de ácido aracdônico na orelha ou da injeção intraplantar de carragenina, respectivamente, em camundongos anestesiados para cada grupo experimental. Em seguida o material foi pesado e, para cada 10 mg de tecido foram adicionados

100µL do tampão de extração de citocinas (0,4M de NaCl, 0,05% tween20, 0,5% de BSA, 0,1mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20KI de aprotinina diluídos em PBS 1X). O material foi imediatamente macerado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C para posterior quantificação de citocina.

4.9. Quantificação de Interleucina-1β

IL-1β foi quantificada pela técnica de ELISA sanduíche utilizando kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para a citocina. Placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50µL do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-IL-1β), diluído em PBS, a 4°C *overnight*. As placas foram lavadas 3x com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma) em seguida foi adicionado 100µL da solução de PBS-BSA 1% (Sigma) e deixado por 2 horas à temperatura ambiente com o objetivo de bloquear sítios não específicos. As placas foram lavadas mais uma vez e incubadas com 50µL das amostras por poço em duplicata e da citocina padrão em várias concentrações por 12 horas à 4°C. Após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo anti-IL-1β biotilado e as placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 µL/poço de estreptavidina diluída 1:200, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com 50µL/poço de solução reveladora contendo 10mL de tampão citrato-fosfato 1M, 2 µL de H₂O₂ e uma pastilha TMB (Sigma). O bloqueio da reação foi feito através da adição de 50µL/poço de ácido fosfórico 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

4.10. Toxicidade aguda

O método descrito por Lorke (1983), com pequenas modificações, foi utilizado para avaliar a segurança de EMA. Brevemente, camundongos machos saudáveis foram divididos em grupos de cinco camundongos cada. EMA (100 e 1000mg/Kg) ou veículo foram administrados pela via intraperitoneal. Consumo de comida e água, sinais de toxicidade e o comportamento geral dos camundongos foram observados continuamente por 1 hora após o tratamento, intermitentemente por 4 horas e esporadicamente por um período de 24 horas. Os animais foram observados diariamente por até 14 dias após o tratamento. Foram considerados sinais de toxicidade: piloereção, agressividade, aumento de movimentação, ptose, alteração respiratória, alteração do tônus muscular, tremor e convulsão e/ou mortalidade.

4.11. Função motora: teste de rota rod

Com o objetivo de descartar efeito depressor sobre o SNC ou efeitos não específicos como relaxamento muscular, a função motora de animais tratados com EMA foi avaliada no aparelho de rota rod (Dunham e Miya 1957). Esse aparelho (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) é constituído de uma barra horizontal rugosa de 3 cm de diâmetro, localizada a 25 cm de altura, subdividida em cinco compartimentos e que gira em velocidade constante (Figura 5). Foi realizada uma pré-seleção com os animais dois dias antes do experimento, quando foram selecionados animais que se mantiveram em equilíbrio sobre a barra girando a cinco rotações por minuto (r.p.m.) durante 2 minutos em no máximo três tentativas (Egashira, Tanoue *et al.* 2004). Os critérios de seleção adotados foram os mesmo parâmetros utilizados no dia experimento. Os resultados são expressos pela média de tempo em segundos (s) em que os animais permaneceram no aparelho.



Figura 5 - teste de rota rod em camundongos
Fonte: acervo pessoal

4.12. Drogas e administração

Indometacina, carragenina, dexametasona, ácido aracdônico, PBS (tampão fosfato-salina), Tween 20, PMSF, benzamethonium chloride, EDTA, aprotinina A e TMB foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Diazepam foi obtido da Cristália (Itapira, São Paulo, Brazil). Indometacina foi dissolvida em salina/Tris HCl 0,1M, dexametasona foi dissolvida em salina contendo 10% de etanol. O extrato metanólico de *Adiantum* (EMA) e as demais drogas foram dissolvidos diretamente em salina. As drogas foram administradas pela via oral (PO), intraperitoneal (IP) ou subcutânea (SC). A administração oral foi realizada por *gavage*.

4.13. Análise estatística

Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de medidas feitas com 5-9 animais por grupo. Comparação entre três ou mais tratamentos foi feita utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. Em estudos de medidas repetidas foi utilizado ANOVA de duas vias seguido do teste de

Bonferroni. Todos os dados foram analisados utilizando o software Prisma 5.01 (GraphPad, San Diego, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito antinociceptivo de EMA na nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos

A atividade antinociceptiva de EMA foi inicialmente avaliada utilizando o teste de contorções abdominais em camundongos. A administração intraperitoneal de EMA (1-100 mg/Kg), 40 minutos antes da injeção de ácido acético, produziu uma inibição significativa e dose-dependente do número de contorções induzidas pelo ácido acético nos camundongos (Fig. 6A). Indometacina (10 mg/Kg/IP), um AINE padrão utilizado como controle positivo, também produziu uma inibição significativa do número de contorções induzidas pelo ácido acético. Além disso, a administração oral de EMA (100-400 mg/Kg), 50 minutos antes da injeção do ácido, também produziu uma inibição significativa do número de contorções induzidas pelo ácido acético de forma dose-dependente (Fig. 6B).

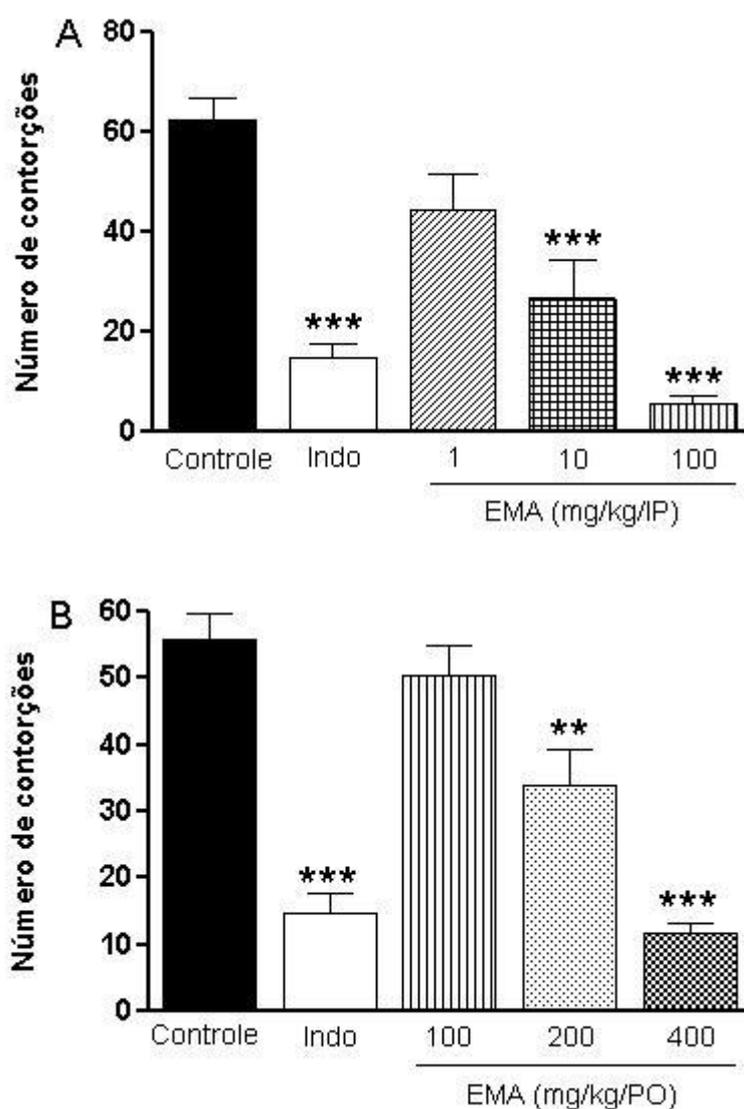


Figura 6 - Efeito antinociceptivo da administração intraperitoneal ou oral do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) no modelo de contorções abdominais em camundongos. (A) Camundongos foram tratados com EMA (1, 10, e 100 mg/Kg) ou salina (grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de ácido acético 0,8% (tempo zero). **(B)** Camundongos foram tratados por via oral com EMA (100, 200 e 400 mg/Kg) ou salina (grupo controle) 50 minutos antes a injeção de ácido acético 0,8%. Indometacina (Indo; 10 mg/Kg/IP) foi utilizada como droga de referência. Dados são expressos como média \pm E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. ** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,01$), *** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,001$), determinada pelo teste de ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.2. Efeito antinociceptivo de EMA na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em ratos

A figura 7 mostra o efeito de EMA na hipernocicepção induzida pela formalina em ratos. A injeção de formalina em animais controle induziu um comportamento nociceptivo bifásico, com a fase inicial de 0 a 10 minutos (Fig. 7A) e a fase tardia de 10 a 60 minutos (Fig. 7B) após a injeção. O tratamento com EMA (100 mg/Kg) pela via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção de formalina causou efeito antinociceptivo tanto na fase inicial quanto na fase tardia da hipernocicepção induzida pela formalina. Similarmente, a indometacina (5 mg/Kg/IP) também produziu efeito antinociceptivo significativo nas duas fases do teste da formalina.

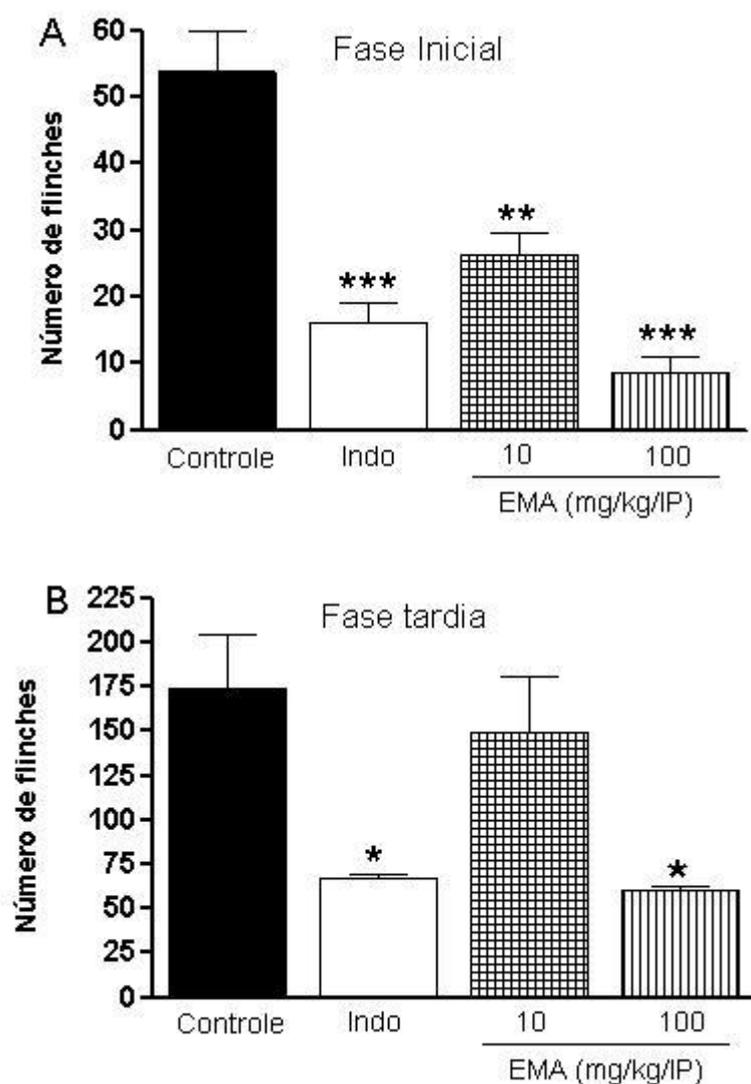


Figura 7 - Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) na nocicepção induzida pela formalina em ratos. Painéis **A** e **B** representam os efeitos de EMA nas fases inicial e tardia do teste da formalina em ratos, respectivamente. Ratos Wistar foram tratados com EMA (10 e 100 mg/Kg) ou salina (grupo controle) pela via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção intraplantar subcutânea de formalina (1%; 50 μ L; tempo zero). Indometacina (Indo; 5 mg/Kg/IP) foi utilizada como droga de referência. Dados foram expressos como média \pm E.P.M; $n=6$ ratos por grupo. * significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$), ** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,01$), *** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,001$) determinado pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

5.3. Contribuição de mecanismos centrais para o efeito antinociceptivo de EMA

A atividade antinociceptiva de EMA foi também analisada no teste de retirada de cauda em ratos. Este teste é ideal para indicar analgésicos de ação central, como é

o caso da morfina e seus derivados. O resultado apresentado na tabela 1 mostra que EMA (10 e 100 mg/Kg) não foi capaz de alterar de forma significativa o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico.

Tabela 1 - Efeito de EMA no teste de retirada de cauda em ratos

Tratamento	Tempo de latência (s) (basal)	Tempo de latência (s) (pós-tratamento)	n
Controle	6,27 ± 0,32	5,1 ± 0,22	5
EMA 10 mg/Kg/IP	6,56 ± 0,41	5,23 ± 0,36	5
EMA 100 mg/Kg/IP	6,53 ± 0,10	5,56 ± 0,47	5

Extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) ou salina (controle) foram administrados 40 minutos antes do teste. Dados são expressos como média do tempo de latência ± E.P.M.; $n=5$ camundongos por grupo. Teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.4. Atividade antiinflamatória de EMA no edema de pata induzido por carragenina

O efeito antiinflamatório de EMA foi avaliado no modelo de edema de pata induzido por carragenina. A administração de EMA (100 mg/Kg/IP) em camundongos 40 min ou 4h antes da injeção de carragenina reduziu significativamente o edema de pata (Fig. 8).

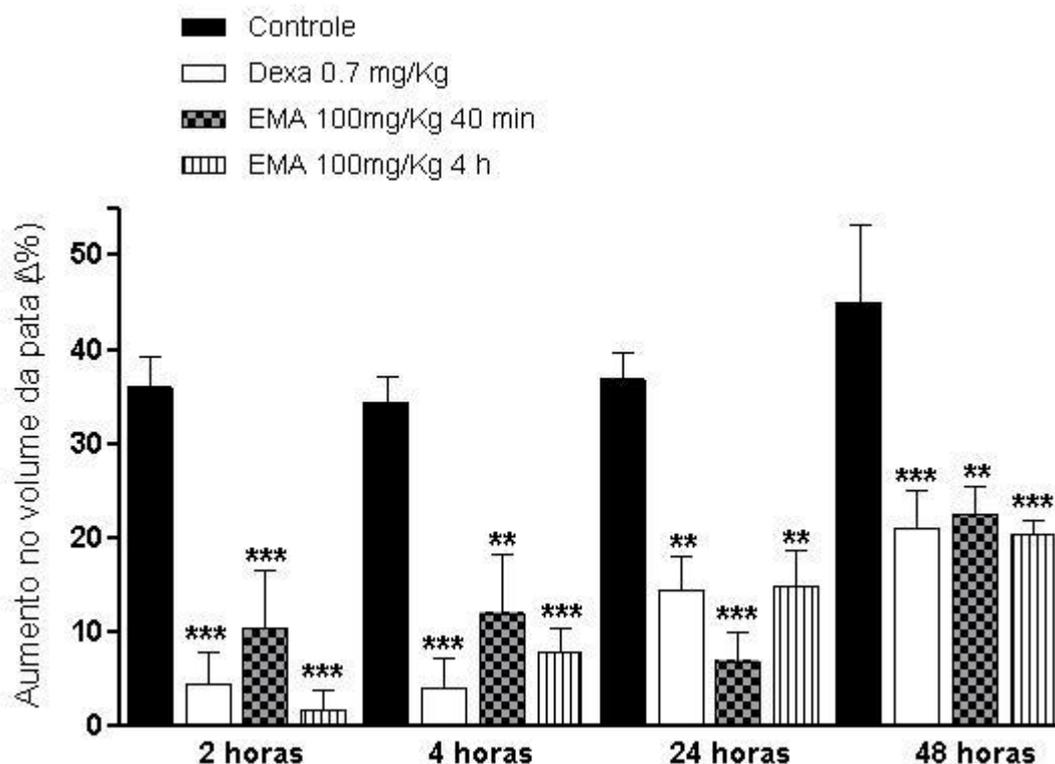


Figura 8 - Efeito antiinflamatório do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) na inflamação da pata induzida por carragenina. Edema de pata medido em 2, 4, 24 e 48 h após a administração intraplantar de carragenina. Inflamação foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina (200 μ g/25 μ l/pata) em camundongos. EMA (100 mg/Kg) ou salina (grupo controle) foram administrados pela via intraperitoneal 40 min ou 4h antes da carragenina (injetada no tempo zero). Dexametasona (0,7 mg/Kg/SC), a droga de referência, foi administrada 4h antes da carragenina. Dados são expressos como média \pm E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. ** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), *** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), determinada pelo teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

Já que o efeito antiinflamatório máximo de EMA foi observado com 4h de pré-tratamento, esse tempo foi escolhido para os próximos experimentos de inflamação. A administração de EMA (100 e 200mg/Kg/IP) 4h antes da carragenina reduziu significativamente o edema de pata 2, 4, 24 e 48h após a injeção do estímulo (Fig. 9A). Similarmente, o edema de pata foi inibido em 2, 4, 24 e 48h pelo pré-tratamento (4h antes) com dexametasona (0,7 mg/Kg/SC).

Em outra série de experimentos, avaliamos se o efeito antiinflamatório de EMA envolve a redução dos níveis de interleucina-1 β , uma citocina pró-inflamatória. Os resultados da figura 9B mostram que a administração de EMA (100 e 200mg/Kg/IP)

4h antes da injeção de carragenina reduziu significativamente os níveis de IL-1 β nas patas inflamadas, quando comparadas com o grupo tratado com o veículo.

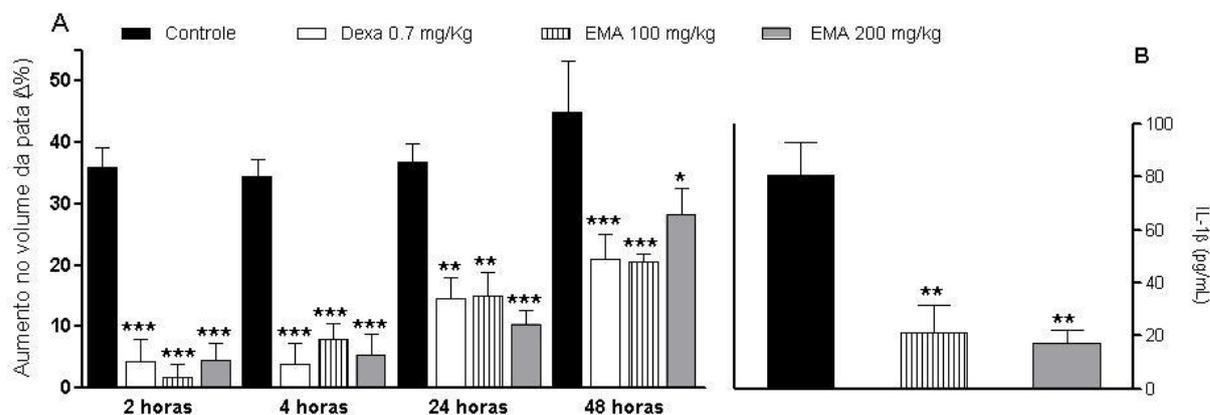


Figura 9 - Efeitos antiinflamatórios do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) na inflamação da pata induzida por carragenina. (A) Edema de pata medido em 2, 4, 24 e 48 h após a administração intraplantar de carragenina. **(B)** Níveis de IL-1 β na pata inflamada, medidos 3h após a injeção de carragenina. Inflamação foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina (200 μ g/25 μ l/pata) em camundongos. EMA (100 e 200 mg/Kg) ou salina (grupo controle) foram administrados pela via intraperitoneal 4h antes da carragenina (injetada no tempo zero). Dexametasona (0,7 mg/Kg/SC), a droga de referência, foi administrada 4h antes da carragenina. Dados são expressos como média \pm E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. * significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$), ** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,01$), *** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,001$), determinado pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni (painel A) ou teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey (painel B).

5.5. Atividade antiinflamatória de EMA em modelo de edema de orelha

Para melhor investigar as propriedades antiinflamatórias de EMA, sua atividade foi também avaliada no modelo de edema de orelha induzido por ácido aracdônico (Fig. 10). A administração de EMA (200 mg/Kg/IP) em camundongos 4 horas antes da injeção local de ácido aracdônico reduziu significativamente o edema de orelha (Fig. 10A). Em seguida, avaliamos se nesse modelo o efeito antiinflamatório de EMA também envolve a redução dos níveis locais de interleucina-1 β . Os resultados da figura 10B mostram que, como esperado, a injeção de ácido aracdônico promove um

aumento local dos níveis de interleucina-1 β 1h após o desafio. A administração de EMA (200 mg/Kg/IP) 4 horas antes do estímulo inflamatório reduziu significativamente os níveis de interleucina-1 β nas orelhas inflamadas, quando comparados com o grupo controle, tratado com salina (Fig. 10B).

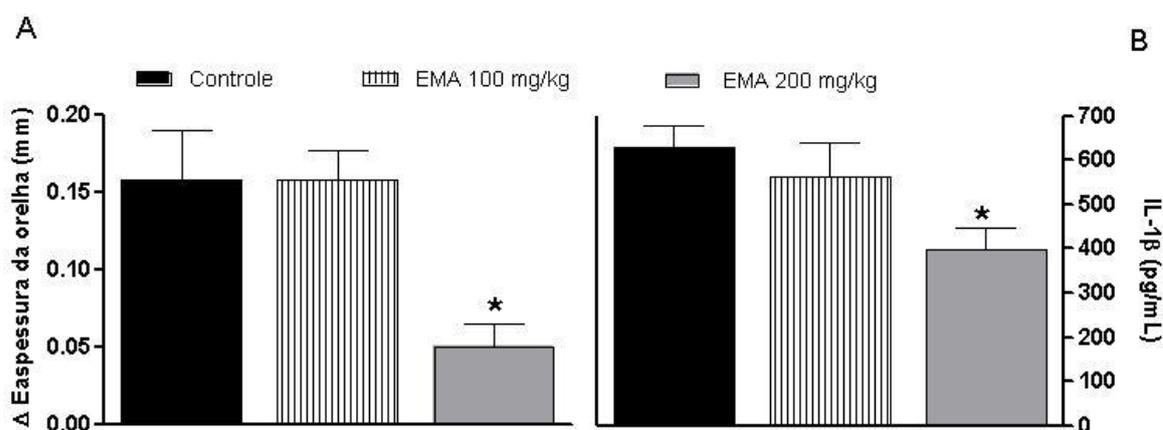


Figura 10 - Efeitos antiinflamatórios do extrato metanólico de *Adiantum latifolium* (EMA) na inflamação de orelha induzida pelo ácido aracdônico. (A) Edema de orelha medido 1 hora após a administração de ácido aracdônico (2 mg/20 μ L/orelha). **(B)** Níveis de interleucina-1 β da orelha inflamada medidos 1 horas após a injeção de ácido aracdônico. EMA (100 e 200 mg/Kg) ou salina (grupo controle) foram administrados por via intraperitoneal 4 horas antes da injeção de ácido aracdônico (tempo zero). Dados são expressos como média \pm E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. * significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,05$), determinado pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.6. Análise química

Através de avaliação cromatográfica por cromatografia em camada delgada (CCD), foi detectada em EMA a presença de numerosos terpenos, esteróides, flavonóides e ácidos fenólicos. Alcalóides e cumarinas não foram detectados.

5.7. Determinação da parte da planta (*Adiantum latifolium*) que contém a substância bioativa responsável pela atividade antinociceptiva

A figura 11 mostra a avaliação do efeito antinociceptivo de extratos metanólicos de EMA (100 mg/Kg) obtidos de diferentes partes de *Adiantum latifolium* no teste de

contorções abdominais. Como demonstrado, os extratos metanólicos do pecíolo e do caule+raiz apresentaram atividade antinociceptiva de igual magnitude aos efeitos observados com o extrato metanólico da folha.

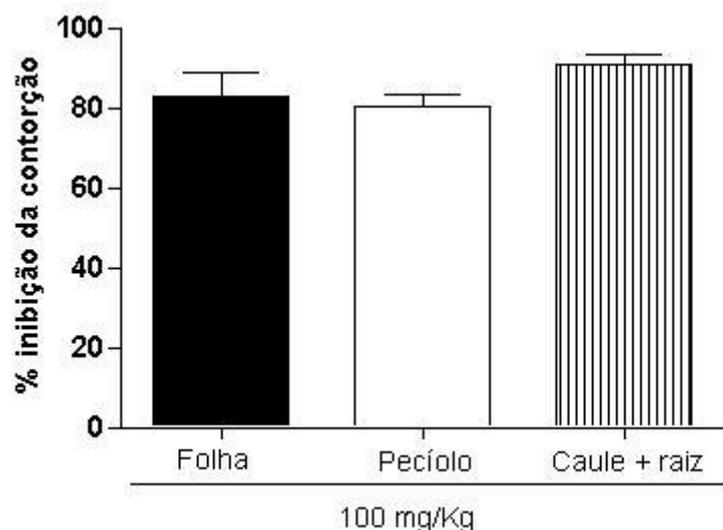


Figura 11 – Comparação da atividade antinociceptiva dos extratos metanólicos da folha, pecíolo e caule+raiz de *Adiantum latifolium*. A figura representa a porcentagem de inibição das contorções abdominais em relação ao grupo controle. Camundongos foram tratados com os diferentes extratos (100 mg/Kg) ou salina (grupo controle), pela via intraperitoneal, 40 minutos antes da injeção de ácido acético 0,8% (tempo zero). Dados são expressos como média \pm E.P.M; $n=6$ camundongos por grupo. Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.8. Determinação da fração de EMA que contém a(s) substância(s) bioativa(s) responsável(is) pela atividade antinociceptiva

Para determinar a fração de EMA (extrato metanólico da folha) que contém a substância responsável pelo efeito antinociceptivo, o efeito das diferentes frações (butanólica, em acetato de etila, em diclorometano e hexânica) foi investigado no teste de contorções abdominais. Os resultados apresentados na figura 12 indicam que todas as frações exerceram atividade antinociceptiva significativa, porém as frações butanólica e em acetato de etila apresentaram eficácia superior, sendo então consideradas as frações mais ativas.

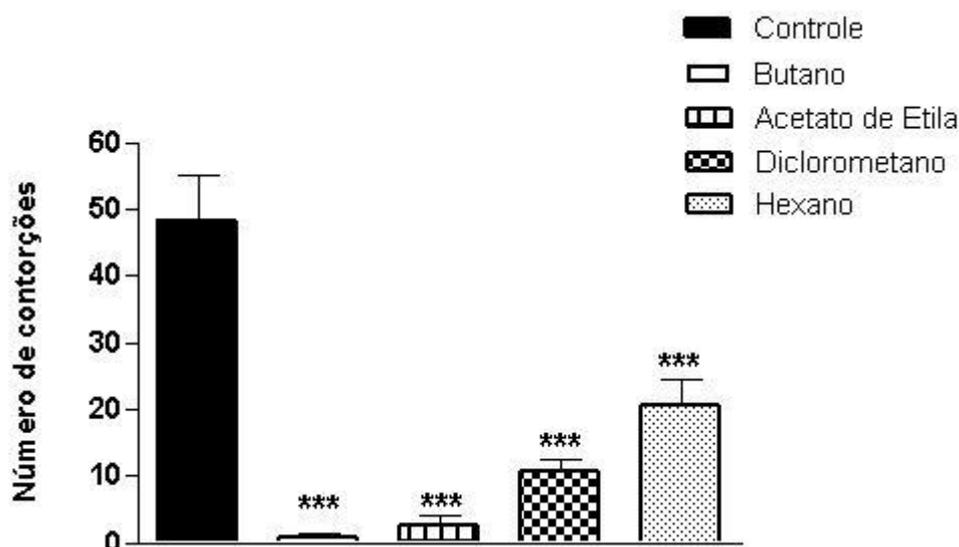


Figura 12 - Comparação da atividade antinociceptiva de diferentes frações do extrato de EMA. Camundongos foram tratados com as frações de EMA (100 mg/Kg) ou salina (grupo controle), pela via intraperitoneal, 40 minutos antes da injeção de ácido acético 0,8% (tempo zero). Dados são expressos como média ± E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. *** significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p<0,001$). Teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.9. Avaliação da interferência de EMA no desempenho motor dos camundongos

A fim de detectar prejuízos neurológicos, como sedação, ataxia e hiperexcitabilidade ou comprometimento motor, que possam ter interferido na resposta comportamental nociceptiva, o efeito de EMA foi avaliado no teste de rota rod. O resultado apresentado na tabela 2 mostra que os camundongos tratados com EMA (200 mg/Kg/IP) não mostraram qualquer alteração significativa na performance motora quando comparados com o grupo controle, tratado com salina. Como esperado, o depressor do sistema nervoso central diazepam (10 mg/Kg/IP), utilizado como droga de referência, reduziu significativamente o tempo de permanência dos camundongos no aparelho de rota rod em relação ao grupo controle.

Tabela 2 - Efeito de EMA sobre o desempenho motor dos camundongos no aparelho de rota rod

Tratamento	Dose (mg/Kg)	n	Tempo (s) no rota rod/120s
Controle (salina)	0,1mL/10g	5	105,4 ± 8,1
EMA	200	5	113,1 ± 3,6
Diazepam	10	5	6,1 ± 1,9 ***

EMA ou salina (controle) foram administrados 40 minutos antes e o diazepam 30 minutos antes da realização do teste. Cada grupo representa a média do tempo de permanência de cinco animais em até três tentativas sobre a barra. Dados são expressos como a média do tempo de permanência (s) ± E.P.M ***significativamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de Turkey.

5.10. Avaliação de toxicidade aguda

Durante o período de observação dos animais no estudo (14 dias), não ocorreram mortes nem qualquer variação na aparência geral ou sinais de toxicidade nos camundongos tratados pela via intraperitoneal com 100 ou 1000 mg/Kg de EMA.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou pela primeira vez a atividade antinociceptiva de *Adiantum latifolium*, uma samambaia terrestre bem distribuída nas Américas tropicais, sobretudo no Brasil. A administração sistêmica do extrato metanólico de *Adiantum latifolium*, em doses que não induzem qualquer sinal de toxicidade e alteração na performance motora dos animais, produziu efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios consistentes em diferentes modelos experimentais. De acordo com os resultados, e em função do reconhecido papel de IL-1 β na dor inflamatória, propõe-se que a inibição da liberação desta citocina contribui para o efeito antinociceptivo de EMA.

A administração intraperitoneal de EMA produziu uma antinocicepção dose-dependente quando avaliada no teste de contorções induzido pelo ácido acético em camundongos. Entretanto, a administração oral de EMA foi menos potente e eficaz do que a administração intraperitoneal em prevenir a nocicepção induzida pelo ácido acético. De fato, a biodisponibilidade de substâncias ativas pode ser diminuída quando administradas pela via oral, devido à instabilidade nos fluidos gástricos e intestinais e/ou pela pouca absorção no trato gastrointestinal (Kofi-Tsekpo 1994). O teste de contorção tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de *screening* para a avaliação de propriedades analgésicas e antiinflamatórias de substâncias novas (Collier, Dinneen *et al.* 1968), apresentando boa sensibilidade porém pouca especificidade. Portanto, a fim de evitar uma má interpretação dos resultados, os efeitos antinociceptivos de EMA foram em seguida avaliados no teste da formalina.

O ensaio da formalina é considerado um modelo experimental de dor com duas fases distintas, que podem relacionar-se a diferentes tipos de dor (Hunskar e Hole

1987). As fases inicial e tardia do teste da formalina têm propriedades diferentes e, conseqüentemente, este teste é útil não somente para avaliar substâncias antinociceptivas, mas também para indicar possíveis mecanismos envolvidos (Shibata, Ohkubo *et al.* 1989). A fase inicial, denominada nociceptiva ou não inflamatória, é o resultado da estimulação direta de nociceptores e tem mediação central; a fase tardia, denominada inflamatória, é causada pela inflamação local, com liberação de mediadores hiperalgésicos e inflamatórios (Hunskaar e Hole 1987). Neste trabalho, foi demonstrado que a administração de EMA teve atividade antinociceptiva tanto na fase inicial quanto na fase tardia do teste da formalina. Considerando as propriedades inibitórias de EMA na segunda fase da formalina, sugere-se que a atividade antinociceptiva pode ser devida, pelo menos em parte, à ação antiinflamatória.

Em concordância com essa idéia, o tratamento com EMA não preveniu a nocicepção no teste do tail flick. A resposta no teste térmico de tail flick é considerada um reflexo espinal, mas também pode envolver estruturas neurais superiores, e conseqüentemente esse método identifica principalmente analgésicos centrais (Jensen e Yaksh 1986; Le Bars, Gozariu *et al.* 2001). O fato de EMA não induzir efeito antinociceptivo no teste do tail flick, sugere que EMA não bloqueia a transmissão neural de dor, como os opióides fazem, mas provavelmente induz uma analgesia periférica.

Durante a avaliação de atividade antinociceptiva em testes comportamentais, é importante confirmar que a ausência de resposta nociceptiva decorre de efeito antinociceptivo, e não de alterações motoras inespecíficas induzidas pelo fármaco (Millan 1999). Por essa razão, foi fundamental avaliar a atividade de EMA sobre a função motora dos animais. Foi observado que a administração de doses

terapêuticas de EMA não afetou a performance motora dos camundongos no teste de rota rod. Em função desses resultados, conclui-se que a atividade farmacológica de EMA nos testes nociceptivos não decorre de comprometimento motor ou prejuízos neurológicos, e sim de atividade antinociceptiva específica.

Para corroborar nossa hipótese, ou seja, que o efeito antinociceptivo de EMA está associado a ações antiinflamatórias, avaliamos as propriedades antiinflamatórias de EMA. Para tal, investigamos os efeitos do tratamento com EMA em dois modelos experimentais importantes utilizados no *screening* de novas drogas antiinflamatórias: o edema de pata induzido por carragenina e o edema de orelha induzido pelo ácido aracdônico (Sugishita, Amagaya *et al.* 1981; Carlson, O'Neill-Davis *et al.* 1985; Posadas, Bucci *et al.* 2004).

A injeção de carragenina nos camundongos produz um edema típico bifásico associado com a produção de diversos mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (Di Rosa, Giroud *et al.* 1971; Henriques, Silva *et al.* 1987; Vinegar, Truax *et al.* 1987; Posadas, Bucci *et al.* 2004; Rocha, Fernandes *et al.* 2006). A administração de EMA resultou na inibição acentuada de dois eventos importantes relacionados com a resposta inflamatória induzida pela carragenina: edema e aumento local nos níveis de IL-1 β . Atualmente, é bem aceito que citocinas constituem um link entre lesão celular, ou reconhecimento imunológico, e os sinais inflamatórios locais ou sistêmicos, como, migração celular, edema, febre e hiperalgesia (Ferreira, Lorenzetti *et al.* 1988; Faccioli, Souza *et al.* 1990; Dinarello 2000). Diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos e células gliais produzem IL-1 β , que induz a produção de outros mediadores inflamatórios envolvidos com recrutamento celular, febre, liberação de proteínas de fase aguda e aumento da permeabilidade vascular

(Dinarello 1998). Considerando o papel importante de IL-1 β durante a resposta inflamatória, sugere-se que os efeitos antiinflamatórios de EMA possam ser relacionados com sua habilidade em inibir a liberação de IL-1 β .

O papel de IL-1 β na hipernocicepção inflamatória também tem sido demonstrado. IL-1 β estimula a expressão de COX-2 e a subsequente produção de prostaglandinas (Zucali, Dinarello *et al.* 1986; Crofford, Wilder *et al.* 1994) envolvidas com a sensibilização nociceptiva (Ferreira e Nakamura 1979) e HANDWERKER, 1976). Do mesmo modo, a injeção local de IL-1 β produz hipernocicepção dependente da liberação de prostanóides (Ferreira, Lorenzetti *et al.* 1988). Neste trabalho foi demonstrado que EMA reduziu os níveis locais de IL-1 β . Como a inibição da liberação de IL-1 β pode levar à inibição da produção de prostanóides, é possível que EMA atue prevenindo a sensibilização nociceptiva pela inibição da produção de mediadores que sensibilizam o nociceptor. Considerando que a sensibilização de nociceptores é o denominador comum de diferentes tipos de dor, a redução dos níveis de IL-1 β pode ser responsável pelo efeito antinociceptivo de EMA.

No presente trabalho, foi demonstrado também que o efeito antiinflamatório máximo de EMA foi observado 4h após a sua administração. Esse efeito antiinflamatório tardio pode indicar a dependência da modulação de fatores de transcrição e neossíntese de proteínas envolvidas na resposta inflamatória. De fato, uma propriedade comum a diversas citocinas é a indução do mecanismo de *feedback* positivo, assim como a indução da liberação de outras citocinas e mediadores inflamatórios. IL-1 β induz a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, moléculas de adesão, quimiocinas, óxido nítrico sintase e COX-2, todas essas moléculas relevantes para a resposta inflamatória (Dinarello, Ikejima *et al.* 1987; Van Damme, Opdenakker *et al.* 1987; Ferreira, Lorenzetti *et al.* 1988; Cunha, Lorenzetti *et al.* 1991). Portanto, o

efeito antiinflamatório tardio de EMA pode refletir uma interferência com a síntese da cascata de citocinas e proteínas inflamatórias moduladas por IL-1 β durante a resposta inflamatória.

Confirmando a atividade antiinflamatória de EMA, o edema induzido pelo ácido aracdônico foi inibido significativamente pelo extrato, sendo que essa inibição foi também acompanhada pela redução dos níveis de IL-1 β . A administração local de ácido aracdônico na orelha dos camundongos induz a síntese de PGE₂ e leucotrienos C4 e D4. A síntese desses metabólitos do ácido aracdônico precede ou é coincidente com o aumento da permeabilidade vascular, resultando numa resposta edematogênica (Carlson, O'Neill-Davis *et al.* 1985; Opas, Bonney *et al.* 1985). Além disso, a expressão de IL-1 β é aumentada pela administração local de ácido aracdônico (Chi, Lim *et al.* 2003), e a administração de anticorpo anti IL-1 β suprime o desenvolvimento do edema de orelha induzido pelo ácido aracdônico (Back, Newton *et al.* 1989). Esses dados sugerem um papel chave de IL-1 β no edema induzido pelo ácido aracdônico e estão em concordância com os resultados deste trabalho. Em adição, uma observação importante é que em ambos os modelos de inflamação utilizados, a redução do edema e dos níveis de IL-1 β ocorreram nas mesmas doses, sugerindo que de fato o efeito antiinflamatório de EMA é dependente da inibição de IL-1 β .

Na próxima série de experimentos, realizamos estudos iniciais para a identificação da substância bioativa. Esses estudos compreenderam a avaliação preliminar do perfil químico de EMA por cromatografia em camada delgada e a determinação bioguiada da fração ativa de EMA.

A análise fitoquímica realizada indicou a presença de terpenos, esteróides, flavonóides e ácidos fenólicos, os quais ser responsáveis pelos seus efeitos antinociceptivos e/ou antiinflamatórios de EMA.

Diversos destes compostos têm sido isolados de espécies de *Adiantum* (Nakane, Maeda *et al.* 2002; Melos, Silva *et al.* 2007) como o filiceno, um triterpeno presente nas folhas de *Adiantum cuneatum* com atividade analgésica (Bresciani, Priebe *et al.* 2003; De Souza, Pereira *et al.* 2009). Flavonóides, como a quercetina, possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória relatadas (Valerio, Georgetti *et al.* 2009) e foi encontrada nas folhas de *Adiantum tetraphyllum* (Melos, Silva *et al.* 2007). Vários ácidos fenólicos também têm efeitos antinociceptivos e são comuns na família Pteridaceae (Melos, Silva *et al.* 2007). Por exemplo, derivados do ácido caféico, um ácido fenólico amplamente distribuído nas plantas medicinais, têm propriedades antinociceptivas em modelos murinos (De Campos Buzzi, Franzoi *et al.* 2009). β -Sitosterol, um fitoesteróide com efeitos antinociceptivos relatados (Santos, Niero *et al.* 1995), também foi isolado das folhas de *Adiantum tetraphyllum* (Melos, Silva *et al.* 2007). Entretanto, apesar dos dados da literatura apontarem possíveis candidatos, a determinação da molécula responsável pelas atividades antinociceptiva e antiinflamatória demonstradas nesse trabalho não foi ainda realizada. Estudos de identificação e purificação do constituinte ativo de *Adiantum latifolium* estão em andamento no laboratório.

Nos estudos das frações de EMA, observamos que todas elas reduziram o número de contorções induzidas pelo ácido acético de forma significativa, porém as frações butanólica e em acetato de etila apresentaram efeito antinociceptivo maior. A partir desse dado, essas duas frações foram enviadas para identificação e purificação dos componentes responsáveis pelas atividades antinociceptiva e antiinflamatória.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade do desenvolvimento de um medicamento a partir de *Adiantum latifolium*, avaliamos qual(is) parte(s) da planta contém a substância bioativa. Para tal, investigamos o efeito dos extratos metanólicos de diferentes partes de *Adiantum latifolium* - folha, pecíolo e caule+raiz - no teste de contorções abdominais. Observamos que os três extratos apresentaram atividade antinociceptiva de igual magnitude, indicando que o constituinte bioativo encontra-se em toda a planta. Essa característica é uma grande vantagem, já que dessa forma é possível obter a substância bioativa do extrato total da planta, obtendo maior rendimento.

Atualmente, há um crescente interesse pela utilização de produtos derivados de plantas para o desenvolvimento de medicamentos devido à preocupação com a segurança das drogas sintéticas. Em contraste com os AINES, os inibidores de produção de citocinas exibem atividade modificadora da doença em modelos animais de inflamação crônica (Geiger, Rordorf *et al.* 1994). Assim, a inibição da síntese e/ou liberação de citocinas por agentes não tóxicos é uma estratégia terapêutica promissora para o controle de doenças inflamatórias. Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que *Adiantum latifolium* possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória, associada com a inibição da liberação de IL-1 β , constituindo uma atraente possibilidade para o desenvolvimento farmacológico. Reforça essa idéia, o fato de doses de até 1g/kg do extrato não terem induzido sinais de toxicidade, sugerindo relativa segurança das doses farmacologicamente ativas. Apesar do proposto papel de IL-1 β , os exatos mecanismos envolvidos nos efeitos farmacológicos de *Adiantum latifolium* estão ainda sendo investigados no laboratório.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- *Adiantum latifolium* possui atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor inflamatória.
- *Adiantum latifolium* possui atividade antiinflamatória, associada com redução dos níveis locais de IL-1 β .
- Doses terapêuticas do extrato de *Adiantum latifolium* não induzem alteração da função motora.
- Doses de até 1g/Kg do extrato de *Adiantum latifolium* não induzem sinais de toxicidade ou mortalidade, sugerindo uma segurança terapêutica para as doses farmacologicamente ativas.
- A análise fitoquímica indicou a presença de terpenos, esteróides, flavonóides e ácidos fenólicos, os quais podem ser responsáveis pelos efeitos antinociceptivos e/ou antiinflamatórios de EMA.
- As frações butanólica e acetato de etila são as frações mais ativas do extrato de *Adiantum latifolium*.
- A(s) molécula(s) biotiva(s) encontra(m)-se distribuída(s) igualmente em todas as partes da planta.

8. REFERÊNCIAS

- Apkarian, A. V., M. N. Baliki, *et al.* (2009). "Towards a theory of chronic pain." Prog Neurobiol **87**(2): 81-97.
- Back, O., R. C. Newton, *et al.* (1989). "Systemic interleukin I administration suppresses arachidonic acid-induced ear oedema in the mouse." Br J Dermatol **121**(6): 701-7.
- Barros, I. C. L. e L. H. C. Andrade (1997). Pteridófitas Medicinais (samambaias, avencas e plantas afins). Recife, Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, Recife
- Basbaum, A. I. and C. J. Woolf (1999). "Pain." Curr Biol **9**(12): R429-31.
- Bonica, J. J. e. a. (2010). The management of pain V. 1 Sec. A. History of pain concepts and therapies. p 1-17.
- Bresciani, L. F., J. P. Priebe, *et al.* (2003). "Pharmacological and phytochemical evaluation of *Adiantum ceneatum* growing in Brazil." Z Naturforsch C **58**(3-4): 191-4.
- Calixto, J. B. (2000). "Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)." Braz J Med Biol Res **33**(2): 179-89.
- Calixto, J. B. (2005). "Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view." J Ethnopharmacol **100**(1-2): 131-4.
- Calixto, J. B., A. Beirith, *et al.* (2000). "Naturally occurring antinociceptive substances from plants." Phytother Res **14**(6): 401-18.
- Calixto, J. B., C. Scheidt, *et al.* (2001). "Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs." Expert Opin Emerg Drugs **6**(2): 261-79.
- Calvino, B. e R. M. Grilo (2006). "Central pain control." Joint Bone Spine **73**(1): 10-6.
- Carlson, R. P., L. O'Neill-Davis, *et al.* (1985). "Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents." Agents Actions **17**(2): 197-204.
- Chi, Y. S., H. Lim, *et al.* (2003). "Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression." Biochem Pharmacol **66**(7): 1271-8.
- Chopade, A. R. e W. A. Mulla (2010). "Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia." Eur J Clin Pharmacol.

- Collier, H. O., L. C. Dinneen, *et al.* (1968). "The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse." Br J Pharmacol Chemother **32**(2): 295-310.
- Cragg, G. M., D. J. Newman, *et al.* (1997). "Natural products in drug discovery and development." J Nat Prod **60**(1): 52-60.
- Crofford, L. J., R. L. Wilder, *et al.* (1994). "Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids." J Clin Invest **93**(3): 1095-101.
- Crummey, A., G. P. Harper, *et al.* (1987). "Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds." Agents Actions **20**(1-2): 69-76.
- Cunha, F. Q., B. B. Lorenzetti, *et al.* (1991). "Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain." Br J Pharmacol **104**(3): 765-7.
- Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., *et al.* (2005). "A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1755-60.
- D'Amour, F. E. S., D.L. (1941). "A method for determining loss of pain sensation." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **72**: 74-79.
- De Campos Buzzi, F., C. L. Franzoi, *et al.* (2009). "Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice." Eur J Med Chem **44**(11): 4596-602.
- De Souza, M. M., M. A. Pereira, *et al.* (2009). "Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice." Pharmacol Biochem Behav **93**(1): 40-6.
- Di Rosa, M., J. P. Giroud, *et al.* (1971). "Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine." J Pathol **104**(1): 15-29.
- Dias, J. M. (2009). "Dor: passado, presente e futuro." Revista de anestesia regional e terapêutica da dor **57**.
- Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." Int Rev Immunol **16**(5-6): 457-99.
- Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-8.
- Dinarello, C. A., T. Ikejima, *et al.* (1987). "Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro." J Immunol **139**(6): 1902-10.
- Dogne, J. M., C. T. Supuran, *et al.* (2005). "Adverse cardiovascular effects of the coxibs." J Med Chem **48**(7): 2251-7.

- Dray, A. (1995). "Inflammatory mediators of pain." Br J Anaesth **75**(2): 125-31.
- Dubner, R. e M. A. Ruda (1992). "Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation." Trends Neurosci **15**(3): 96-103.
- Dubuisson, D. e S. G. Dennis (1977). "The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats." Pain **4**(2): 161-74.
- Dunham, N. W. e T. S. Miya (1957). "A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice." J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim) **46**(3): 208-9.
- Egashira, N., A. Tanoue, *et al.* (2004). "V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze." Neurosci Lett **356**(3): 195-8.
- Faccioli, L. H., G. E. Souza, *et al.* (1990). "Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms." Agents Actions **30**(3-4): 344-9.
- Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti, *et al.* (1988). "Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue." Nature **334**(6184): 698-700.
- Ferreira, S. H. e M. Nakamura (1979). "I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process." Prostaglandins **18**(2): 179-90.
- Geiger, T., C. Rordorf, *et al.* (1994). "CGP 47969A: effect on collagen induced arthritis in DBA/1 mice." J Rheumatol **21**(11): 1992-7.
- Goodman e Gilman (2005). As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill.
- Gottlieb, O. R. e M. R. M. B. Borin (2004). Farmacognosia: da planta ao medicamento
- Henriques, M. G., P. M. Silva, *et al.* (1987). "Mouse paw edema. A new model for inflammation?" Braz J Med Biol Res **20**(2): 243-9.
- Hunskar, S. e K. Hole (1987). "The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain." Pain **30**(1): 103-14.
- Jensen, T. S. e T. L. Yaksh (1986). "Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat." Brain Res **363**(1): 99-113.
- Julius, D. e A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-10.

- Kidd, B. L. e L. A. Urban (2001). "Mechanisms of inflammatory pain." Br J Anaesth **87**(1): 3-11.
- Kim, K., P. Brar, *et al.* (2009). "The use of corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: a review of the literature." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **107**(5): 630-40.
- Kipel, A. G. B. (2004). "Prevalência da dor: mitos, medos e desarcertos relacionados ao uso de analgésicos opiáceos." Texto e Contexto Enfermagem **13**(002).
- Koehn, F. E. e G. T. Carter (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." Nat Rev Drug Discov **4**(3): 206-20.
- Kofi-Tsekpo, M. W. (1994). "Optimization of pharmaceutical formulations for therapy." Afr J Health Sci **1**(1): 13-19.
- Lanas, A. e A. Ferrandez (2006). "NSAID-induced gastrointestinal damage: current clinical management and recommendations for prevention." Chin J Dig Dis **7**(3): 127-33.
- Le Bars, D., M. Gozariu, *et al.* (2001). "Animal models of nociception." Pharmacol Rev **53**(4): 597-652.
- Longui, C. A. (2007). "Glucocorticoid therapy: minimizing side effects." Jornal de Pediatria **83**(5 Suppl): S163-171.
- Lopez, A., J. B. Hudson, *et al.* (2001). "Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants." J Ethnopharmacol **77**(2-3): 189-96.
- Lorke, D. (1983). "A new approach to practical acute toxicity testing." Arch Toxicol **54**(4): 275-87.
- Melos, J. L. R., L. B. Silva, *et al.* (2007). "Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* " Química Nova **30**(2): 292-297.
- Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." Prog Neurobiol **57**(1): 1-164.
- Moran, R. C. e G. Yatskievych (1995). "Pteridaceae." Flora Mesoamericana **1**(Psilotaceae a Salviniaceae): 104-145.
- Nakane, T., Y. Maeda, *et al.* (2002). "Fern constituents: triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **50**(9): 1273-5.
- Nonato, F. R., T. A. Barros, *et al.* (2009). "Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract." J Ethnopharmacol **125**(1): 102-7.
- Opas, E. E., R. J. Bonney, *et al.* (1985). "Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid." J Invest Dermatol **84**(4): 253-6.

- Pedersen, L. H., J. Scheel-Kruger, *et al.* (2007). "Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury." *Pain* **127**(1-2): 17-26.
- Peskar, B. M. (1977). "On the synthesis of prostaglandins by human gastric mucosa and its modification by drugs." *Biochim Biophys Acta* **487**(2): 307-14.
- Posadas, I., M. Bucci, *et al.* (2004). "Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression." *Br J Pharmacol* **142**(2): 331-8.
- Robert, A. (1976). "Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins." *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* **2**: 507-20.
- Rocha, A. C., E. S. Fernandes, *et al.* (2006). "Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw." *Br J Pharmacol* **148**(5): 688-95.
- Sa, K., A. F. Baptista, *et al.* (2009). "Prevalence of chronic pain and associated factors in the population of Salvador, Bahia." *Rev Saude Publica* **43**(4): 622-30.
- Santos, A. R., R. Niero, *et al.* (1995). "Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice." *Planta Med* **61**(4): 329-32.
- Schaible, H. G. e F. Richter (2004). "Pathophysiology of pain." *Langenbecks Arch Surg* **389**(4): 237-43.
- Shibata, M., T. Ohkubo, *et al.* (1989). "Modified formalin test: characteristic biphasic pain response." *Pain* **38**(3): 347-52.
- Simões, C. M. O., E. P. Schenkel, *et al.* (2003). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.
- Singh, M., N. Singh, *et al.* (2008). "Antimicrobial activity of some important *Adiantum* species used traditionally in indigenous systems of medicine." *J Ethnopharmacol* **115**(2): 327-9.
- Sostres, C., C. Gargallo, *et al.* (2009). "Drug-related damage of the ageing gastrointestinal tract." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **23**(6): 849-60.
- Spies, C. M., J. W. Bijlsma, *et al.* (2010). "Pharmacology of glucocorticoids in rheumatoid arthritis." *Curr Opin Pharmacol*.
- Sugishita, E., S. Amagaya, *et al.* (1981). "Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats." *J Pharmacobiodyn* **4**(8): 565-75.
- Tapiero, H., G. N. Ba, *et al.* (2002). "Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies." *Biomed Pharmacother* **56**(5): 215-22.

- Teixeira, M. J. e J. A. B. Figueiró Dor evolucao historica dos conhecimentos Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, sindormes dolorosas e tratamento: 8-13.
- Teixeira, M. J. e M. Okada (2001). A Dor na antiguidade: da punição dos deuses à qualidade sensorial. São Paulo, Lemos.
- Tryon, R. M. e R. G. Stolze (1989). Pteridophyta of Peru—Part II: 13. Pteridaceae—15. Dennstaedtiaceae. *Fieldiana, Bot.*, n.s. 22.
- Valerio, D. A., S. R. Georgetti, *et al.* (2009). "Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production." J Nat Prod **72**(11): 1975-9.
- Van Damme, J., G. Opdenakker, *et al.* (1987). "Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor." J Exp Med **165**(3): 914-9.
- Verri, W. A., Jr., T. M. Cunha, *et al.* (2006). "Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?" Pharmacol Ther **112**(1): 116-38.
- Vinegar, R., J. F. Truax, *et al.* (1987). "Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat." Fed Proc **46**(1): 118-26.
- Vitor, A. O. P., E. L. (2008). "Psicofarmacologia da dor: uma revisão bibliográfica." R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde **2**(1): 87-96.
- Wagner, H. e S. Bladt (1994). "Pharmaceutical quality of hypericum extracts." J Geriatr Psychiatry Neurol **7 Suppl 1**: S65-8.
- Walid, M. S., S. N. Donahue, *et al.* (2008). "The fifth vital sign--what does it mean?" Pain Pract **8**(6): 417-22.
- Winter, C. A., E. A. Risley, *et al.* (1962). "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs." Proc Soc Exp Biol Med **111**: 544-7.
- Yonathan, M., K. Asres, *et al.* (2006). "In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*." J Ethnopharmacol **108**(3): 462-70.
- Young, J. M., D. A. Spires, *et al.* (1984). "The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid." J Invest Dermatol **82**(4): 367-71.
- Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." Pain **16**(2): 109-10.
- Zucali, J. R., C. A. Dinarello, *et al.* (1986). "Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2." J Clin Invest **77**(6): 1857-63.