



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



BENEDITO PEREIRA DE SOUSA NETO

Atividade anti-inflamatória do derivado benzoiltriptamínico N-saliciloiltriptamina (NST)
em modelos animais

TERESINA
2016

BENEDITO PEREIRA DE SOUSA NETO

Atividade anti-inflamatória do derivado benzoiltriptaminico N-saliciloiltriptamina (NST)
em modelos animais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais NPPM/CCS da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia

TERESINA

2016

Atividade anti-inflamatória do derivado benzotriptamínico N-saliciloilriptamina (NST)
em modelos animais

BENEDITO PEREIRA DE SOUSA NETO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais NPPM/CCS da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do Título de

Defesa em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira
(Orientador)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez
(Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida
(Examinador Interno)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Prof^a. Dr^a Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Regina Ferraz Mendes

COORDENADORA DO NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS-
NPPM

Prof^a Dr^a Salete Maria da Rocha Cipriano Brito

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida

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

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu condições para realizar este trabalho.

Agradeço à minha família, meus pais Pedro e Lourdes, aos meus irmãos, meus sobrinhos por sempre torcerem pelo meu sucesso e estarem ao meu lado.

Gostaria de dizer muito obrigado ao meu orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira, pelos ensinamentos transmitidos e por contribuir com a minha formação profissional e a minha formação como ser humano, sem a sua orientação, apoio e confiança nada disso seria possível. O senhor é o maior exemplo que tenho de ser humano neste mundo, falo de honestidade, caráter e sabedoria.

Digo meu muito obrigado às professoras doutoras do NPPM, Rita de Cássia, Fernanda Regina, Rosimeire, Aldeídia e Salete. Obrigado aos professores Paulo Humberto, Fernando Aécio, Daniel e Maurício. Estes mestres e doutores me ajudaram a consolidar vários aspectos práticos relacionados a procedimentos experimentais, sendo assim, indispensáveis para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Stanley Juan Gutierrez muito obrigado por fornecer a substância utilizada nesta pesquisa e por seu atencioso acompanhamento.

À minha namorada Layane Valéria pelo apoio e paciência ao longo desses anos.

Aos colegas que me deram apoio logo na minha chegada nesta casa, em especial a Flávia Franceli, Celyane, Luciane, Francilene, Hélio e o Bruno Gomes.

Queria destacar a importância de uma pessoa que foi e sempre será de fundamental importância para todos que passaram pelo NPPM, falo do Carlos Alberto de Deus (seu Carlos), nosso técnico do Biotério que independentemente das festividades do nosso calendário sempre esteve e está por aqui cuidando dos nossos animais.

Queria agradecer ao José Luís Albuquerque Borges (Jôzy) pelo apoio e manutenção dos nossos laboratórios. Estendo os meus agradecimentos a todos os amigos do NPPM.

Aos meus colegas de turma que iniciaram essa jornada comigo.

Os meus sinceros agradecimentos aos meus amigos pela convivência e por sempre estarem disponíveis a ajudar: Everton Lopes, Valmor Macêdo, Pedro Simão, Railson Sousa, Carlos Filho, Antonio Carlos, Couras e Rodrigo.

Queria agradecer aos meus colegas de graduação, mesmo diante de tantos afazeres vez por outra aparecem aqui no nosso NPPM para conversarmos um pouco, aqui represento os demais na pessoa da Shayara Ciriaco.

À Universidade Federal do Piauí através do PPGFARM pela possibilidade de realizar este trabalho.

Meu muito obrigado à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço de uma forma geral ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais-NPPM pelo apoio nestes anos que estive por aqui. Se a frase sábia de Rousseau que diz que o homem é produto do meio é verdade ou não eu realmente não sei, mas de um fato eu tenho certeza, eu me sinto produto do NPPM desde 2008 e isto eu carrego com muito orgulho para a vida toda.

Sei que dizer muito obrigado parece muito simples, mas mesmo assim é o que posso fazer agora diante de todos que me proporcionaram este dia...

SOUSA NETO, B.P. Atividade anti-inflamatória do derivado benzoiltriptaminico N-saliciloiltriptamina (NST) em modelos animais. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, NPPM/CCS/UFPI, 2016.

RESUMO

A inflamação é um fenômeno que envolve a participação de diversos mediadores, como histamina, serotonina, bradicinina, TNF- α , IL-1 β , e as prostaglandinas. Estes mediadores induzem intensa migração de neutrófilos para os tecidos inflamados. Dentre os fármacos utilizados para o tratamento da inflamação incluem os anti-inflamatórios não-esteroidais (coxibes) e os corticoides, entretanto possuem vários efeitos colaterais, especialmente quando utilizados cronicamente. Substâncias que possuem núcleo indólico têm sido utilizadas no tratamento de afecções inflamatórias apresentando boa efetividade e baixa toxicidade. O NST constituído por núcleo indólico apresentou atividades anti-inflamatória e antioxidante em diferentes modelos experimentais. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade anti-inflamatória do derivado benzoiltriptaminico N-saliciloiltriptamina (NST) e os possíveis mecanismos de ação. Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g) e ratos Wistar (150-210g), machos e fêmeas. Para avaliação da atividade antiedematogênica do NST foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Em camundongos, a atividade antiedematogênica do NST foi avaliada diante dos seguintes agentes flogísticos: dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, capsaicina e prostaglandina. Em seguida, investigou-se o efeito do NST sobre a degranulação de mastócitos mesenteriais induzida pelo composto 48/80 (experimento *ex vivo*) em ratos. Utilizou-se também o modelo de peritonite induzida por carragenina para elucidação dos possíveis mecanismos de ação. Inicialmente foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos, análise da concentração de proteínas totais, atividade de mieloperoxidase (MPO), catalase, concentração de nitrito (NO₂⁻) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Avaliou-se também a incapacitação articular induzida por carragenina através do tempo de elevação da pata (TEP) em incapacitômetro. Por fim, avaliou-se a variação do edema, tempo de elevação da pata (TEP) e a migração de leucócitos no modelo de artrite gotosa induzida por cristais de ácido úrico em ratos tratados com NST. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal/UFPI, Nº. 82/2014. O NST 100 e 200 mg/kg (i.p.) reduziu o edema de pata induzido por carragenina da 1^a à 5^a hora (**p*< 0,05). De forma semelhante, o NST na dose de 100 mg/kg reduziu o edema induzido por dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, capsaicina e prostaglandina, durante o tempo de observação (**p*< 0,05). Os grupos tratados com NST nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg inibiram a degranulação de mastócitos (**p*<0,05) quando comparado ao grupo veículo. O NST nas doses de 100 e 200 mg/kg (i.p.) inibiu a migração de leucócitos no exsudato peritoneal, a atividade da mieloperoxidase e catalase; (**p*< 0,05) e as concentrações de NO₂⁻ e TBARS. NST também reduziu significativamente (**p*< 0,05) o (TEP) já na primeira hora após a indução da lesão articular. Por ultimo, o NST nas doses de 100 e 200 mg/kg inibiu tanto a variação do edema o TEP (***p*<0,001) e migração de leucócitos no modelo de artrite gotosa, durante o tempo de observação. Conclui-se por tanto, que a substância em estudo exerce atividade anti-inflamatória através da inibição do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos, por inibir a degranulação de mastócitos, diminuir a migração de leucócitos nos modelos testados e reduzir o estresse oxidativo.

Palavras-chave: N-Saliciloiltriptamina. Núcleo indólico. Atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Inflammation is a phenomenon which involves the participation of various mediators, such as histamine, serotonin, bradykinin, TNF- α , IL-1 β , and prostaglandins. These mediators are able to induce marked neutrophils migration towards inflamed tissues. Among drugs commonly used to treat inflammatory diseases, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticoids are included as the most important drugs. However, both classes are able to induce several side effects, especially when used chronically. Interestingly, compounds which possess an indole nucleus have been used in the treatment of inflammatory diseases, and have demonstrated good efficacy and low toxicity. The N-salicyloyltryptamine (NST) consists of an indole-derivative compound with anti-inflammatory and antioxidant activities in different experimental models. The aim of this study was investigate the anti-inflammatory activity of the NST, and its possible mechanisms of action. Male and female Swiss mice (25-30g) and Wistar rats (150 – 210g) were used. The NST-induced antiedematogenic activity was evaluated on the carrageenan-induced paw edema in rats, as well as the paw edema induced by some phlogistic agents in mice, as follows: dextran, compound 48/80, histamine, serotonin, prostaglandin E2 and capsaicin. Then, the effect of NST was investigated on compound 48/80-induced *ex vivo* mast cell degranulation in mice mesenteric bed. The carrageenan-induced peritonitis model in rats was also used in order to elucidate the possible mechanisms of action. In this model, total and differential leukocyte count, total protein concentration, myeloperoxidase activity (MPO), catalase, nitrite concentration (NO₂⁻) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was determined. The carrageenan-induced rat knee joint incapacitation test was assessed by the determination of paw elevation time (PET). Finally, the variation of edema, paw elevation time (PET), and leukocyte migration were evaluated in gouty arthritis model induced by uric acid crystals in rats treated with NST. All protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee, UFPI, no. 82/2014. The NST (100 and 200 mg/kg. i.p.) was able to reduce the paw edema induced by carrageenan from the first to fifth hour (p<0.05). Similarly, the NST (100 mg/kg) reduced the edema induced by dextran, compound 48/80, histamine, serotonin, prostaglandin E2 or capsaicin during the whole observation time (p<0.05). The experimental groups pretreated with NST (50, 100 and 200 mg/kg) inhibited mast cells degranulation when compared with vehicle group (p<0.05). Furthermore, the NST (100 and 200 mg/kg, i.p.) inhibited leukocytes migration, myeloperoxidase and catalase activity in the peritoneal exudate, as well as NO₂⁻ and TBARS levels (p<0.05). Besides, NST also reduced significantly the paw elevation time within the first hour after joint injury induction (p<0.05). Finally, NST (100 and 200 mg/kg) inhibited both variation of edema and leukocyte migration in the gouty arthritis model, during the whole observation time (p<0.001). Therefore, the NST exerts anti-inflammatory activity demonstrated by the paw edema inhibition induced by different phlogistic agents, probably involving the inhibition of mast cells degranulation, decrease of leukocytes migration, and reduction of oxidative stress-related mediators.

Keywords: N-Salicyloyltryptamine; indole nucleus; Anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação aguda.....	22
Figura 2 - Estrutura química do núcleo indólico.....	37
Figura 3 - Estrutura química da indometacina.....	37
Figura 4 - Estrutura química da N-benzoiltriptamina.....	38
Figura 5 - Estrutura química da N-Saliciloiltriptamina.....	38
Figura 6 - Obtenção do NST 2-hidroxi-N-[2-(1H-indol-3-il) etil] benzamida.....	41
Figura 7 - Esquema da metodologia do edema de pata induzido por carragenina.....	43
Figura 8 -Esquema da metodologia do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.....	44
Figura 9 - Incapacitômetro.....	48
Figura 10 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	53
Figura 11 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos.....	55
Figura 12 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos.....	57
Figura 13 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos.....	58
Figura 14 : Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos.....	60
Figura 15 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por capsaicina em camundongos.....	61
Figura 16 - Efeito antiedematogênico do NST sobre o edema de pata induzido por Prostaglandina PGE ₂ em camundongos.....	63
Figura 17 - Efeito do NST e cetotifeno sobre a desgranulação de mastócitos <i>ex vivo</i> induzida pelo composto 48/80 em ratos.....	64
Figura 18 - Microfotografia representativa do efeito do NST na desgranulação de mastócitos mesentéricos <i>ex vivo</i> induzida pelo Composto 48/80.....	65
Figura 19 - Efeito do NST sobre o número total e diferencial de leucócitos na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	67
Figura 20 - Efeito do NST sobre a dosagem de proteínas totais no exsudato peritoneal de camundongos.....	68
Figura 21 - Efeito do NST na atividade da mieloperoxidase em peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	69

Figura 22 –. Efeito do NST sobre a atividade da enzima catalase na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	70
Figura 23 – Efeito do NST sobre a concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) em peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	71
Figura 24 - Efeito do NST sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	72
Figura 25 - Efeito do NST sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina em ratos.....	74
Figura 26 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por cristais de urato monossódico (artrite gotosa) em ratos.....	78
Figura 27 - Efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico (artrite gotosa) em ratos.....	80
Figura 28 - Efeito do NST no número total e diferencial de leucócitos na incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico em ratos.....	82
Figura 29 - Fotografias do efeito do NST sobre o edema de pata induzido por cristais de ácido úrico em ratos.....	83
Figura 30 –Efeito do NST sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod	85
Figura 31 – Efeito do NST sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações químicas do NST.....	41
Tabela 2- Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos....	54
Tabela 3 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos.....	56
Tabela 4 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido pelo 48/80 em camundongos.....	57
Tabela 5 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos.....	59
Tabela 6 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos.....	60
Tabela 7 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por capsaicina em camundongos.....	62
Tabela 8 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E ₂ em camundongos.....	63
Tabela 9 -Efeito do NST sobre o tempo de elevação da pata (TEP) em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina em ratos.....	75
Tabela 10 - Efeito do NST sobre o edema de pata induzida por cristais de urato monossódico em ratos.....	79
Tabela 11- Efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico em ratos.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AA : Ácido araquidônico
- I.A: Intra-articular
- ACTH: Adrenocorticotrófico
- AAS: ácido acetil salicílico
- AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais
- ANOVA one way: Análise de variância de uma via
- CAT: Catalase
- Cg: Carragenina
- COX: cicloxigenase
- COX-1: cicloxigenase-1
- COX-2: cicloxigenase-2
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
- EROs: espécies reativas de oxigênio
- ERNs: espécies reativas de nitrogênio
- E.P.M: Erro padrão da média
- GTP:Trifosfato de guanosina
- 5-HT: Serotonina
- H₁: receptor de histamina
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio
- HPA: Eixo hipotálamo hipófise adrenal
- HMGB1: proteína de alta mobilidade do grupo B1
- i.pl: intraplantar
- IL-1 β : interleucina-1 β
- IL-6: interleucina-6
- IL-8: interleucina-8
- IL-10: interleucina-10
- IL-12: interleucina-12

IgE: Imunoglobulina E

Indo: indometacina

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LOX: lipoxigenase

LPS: lipopolissacarídeo

LT: Leucotrieno

LTB4: leucotrieno B4

LTA4: leucotrieno A4

MMPs: Metaloproteinases

MEC: Matriz extra celular

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos

M-CFS: Fator estimulador de colônias de macrófagos

MAPK: mitógeno ativado por proteínas quinases

MPO: mieloperoxidase

NF-KB: fator nuclear kappa B

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NST: N-Saliciloilriptamina

NOS: óxido nítrico sintase

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: Peroxinitrito

OH⁻: Hidroxila

PRRS: Receptor de reconhecimento de padrão

PAF: fator ativador de plaquetas

PG: prostaglandina

PGE2: prostaglandina E2

PKC: proteína quinase C

PKA: proteína quinase A

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

SOD: superóxido dismutase

TEP: Tempo de elevação da pata

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TX: tromboxano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Considerações gerais.....	19
1.2 Inflamação aguda.....	21
1.3 Inflamação crônica.....	24
1.4 Mediadores químicos da inflamação.....	25
1.5 Estresse oxidativo.....	28
1.6 Tratamento farmacológico.....	29
1.7 Plantas medicinais	32
1.8 Alcaloides indólicos.....	36
2 OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo geral.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Drogas, reagentes, soluções e equipamentos.....	40
3.2. Obtenção do N-Saliciloilriptamina, 2-hidroxi-N-[2-(1H-indol-3- il) etil] benzamida (NST).....	40
3.3 Equipamentos.....	41
3.4 Animais utilizados.....	41
3.5. Ensaio farmacológico.....	42
3.5.1 Toxicidade aguda em camundongos.....	42
3.5.2 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	42
3.5.3 Ação do NST nos edemas de pata induzidos por dextrana, (dext), composto 48/80, (comp 48/80) histamina, (hist) serotonina, (5-HT) capsaicina (caps) e prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos.....	43
3.5.4 Efeito do NST sobre a desgranulação de mastócitos <i>ex vivo</i> induzida pelo composto 48/80 em ratos.....	44
3.5.5 Efeito do NST na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	45
3.5.6 Contagem de leucócitos total e diferencial no lavado peritoneal de camundongos.....	45
3.5.7 Dosagem de proteínas no exsudato peritoneal de camundongos.....	45
3.5.8 Efeito do NST sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal de camundongos.....	46
3.5.9 Avaliação da atividade da catalase (CAT) no exsudato peritoneal de camundongos.....	46

3.5.10 Avaliação da concentração do nitrito (NO ₂ ⁻) no exsudato peritoneal de camundongos.....	47
3.5.11 Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no exsudato peritoneal de camundongos.....	47
3.5.12 Avaliação do efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por carragenina em ratos.....	48
3.5.13 Efeito do NST sobre o edema, dor periférica e migração de leucócitos em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico (ácido úrico) em ratos.....	49
3.5.14 Efeito do NST sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod.....	50
3.5.15 Efeito do NST sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto.....	50
3.5.16. Análise Estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1. Avaliação da toxicidade aguda do NST em camundongos.....	52
4.2. Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	52
4.3 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos.....	55
4.4. Ação do NST sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos.....	56
4.5 Ação do NST sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos.....	58
4.6. Ação do NST sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos.....	59
4.7. Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por capsaicina em camundongos.....	61
4.8. Ação antiedematogênica do NST sobre o edema de pata induzido por PGE ₂ em camundongos.....	62
4.9 Efeito do NST sobre a degranulação de mastócitos <i>ex vivo</i> induzida pelo composto 48/80 em ratos.....	64
4.10. Efeito do NST sobre o número de leucócitos (contagem total e diferencial) no exsudato de peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	66
4.11. Dosagem de proteínas totais no exsudato peritoneal de camundongos.....	68
4.12. Efeito do NST sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	69

4.13. Efeito do NST sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	70
4.14 Efeito do NST sobre a concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos.....	71
4.15. Atividade do NST sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos.....	72
4.16. Efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por carragenina.....	73
4.17. Efeito do NST sobre o edema, a dor periférica e o número de leucócitos (contagem total e diferencial) em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico em ratos.....	76
4.18. Efeito do NST sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod.....	85
4.19. Efeito do NST sobre a capacidade exploratória em camundongos no teste do campo aberto.....	85
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO	106
7 PERSPECTIVAS	107
REFERENCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A palavra inflamação tem origem a partir de dois idiomas, o grego *phlogosis* e o latim *flamma*, que independentemente da origem, significam “fogo”, ou “área em chamas,” algumas descrições de inflamação podem ser encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C. (CASTARDO et al., 2008).

No entanto, o primeiro autor a caracterizar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Cornélio Celsus por volta do século I d.C. (LEME et al., 2006). Este descreveu as principais características inflamatórias: dor, rubor, calor e tumor (DORWARD et al., 2012). O quinto sinal cardinal da inflamação, *functio laesa* (perda da função), foi descrito por Rudolph Virchow na segunda metade do século XIX em seu livro *Cellular Pathologie* (JORIS, 2004). Os sinais cardinais da inflamação são resultado da vasodilatação (calor e rubor), do acúmulo de leucócitos e do extravasamento de fluido intersticial (tumor ou edema), ocorre também a estimulação das terminações nervosas por mediadores (dor) e por último sobrevém a inibição do reflexo muscular e rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (ALLER et al., 2006).

A inflamação ocorre mediante uma série de respostas celulares e moleculares e serve para proteger o indivíduo contra infecções ou outros agentes agressores. Essas respostas, também, auxiliam a recuperação do tecido danificado e a ativação do sistema imune (MEDZHITOV, 2008; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). O sistema imune é dividido em inato e adaptativo (WILLIAMS; BARNES; PORTNOY, 2016) e este último, trabalha em conjunto com o sistema inato para resistir aos mais diferentes tipos de infecções e manter a homeostase, isso depende em grande parte do reconhecimento e da resposta a estes estímulos, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em diferentes tipos celulares (SALEH, 2011).

Os principais iniciadores do processo inflamatório são as células do sistema imune, que podem ser divididas em células imunes pró e anti-inflamatórias cujo equilíbrio e a função celular controlam rigorosamente os processos inflamatórios em curso (LEE et al., 2013). Por exemplo, quando as células são infectadas por bactérias ou vírus, os sinais de perigo produzidos por estas células são detectados

por células do sistema imunes, inicialmente os neutrófilos. Em seguida, migram para o local da infecção, onde, a partir de então, produzem uma série de quimiocinas que recrutam outras células de defesa. Os macrófagos são recrutados posteriormente, seguidos pelos linfócitos. Os macrófagos são responsáveis pela morte dos patógenos e remoção das células infectadas, promovendo assim a resolução da inflamação e a cura do indivíduo (LEE et al., 2014).

Em geral a inflamação é induzida por um agente externo de natureza biológica, como detalhado anteriormente, no entanto, a mesma pode ser induzida sem a presença deste agente, neste caso, denominada de inflamação estéril. Dessa forma, as células estimulam principalmente a produção de Padrões Moleculares Associados à Lesão (DAMPs), que consistem em moléculas próprias do tecido e que, no geral, têm sua existência restrita ao meio intracelular, mas que são liberadas mediante lesão física ou química; determinadas proteínas, como proteínas de alta mobilidade do grupo B1 (HMGB1) que funcionam como sentinelas universais para respostas mediadas por vários agentes (BIANCHI; CELONA, 2010); e os PRRs (Receptores de reconhecimento de padrões) que são responsáveis para reconhecer padrões moleculares e iniciar a resposta inflamatória (BROGGI; GRANUCCI, 2015).

Assim como a inflamação induzida por agentes microbianos, a inflamação estéril é caracterizada, sobretudo, pela infiltração de neutrófilos e macrófagos e produção de quimiocinas e citocinas tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (CHEN; NUÑEZ, 2010, MURAKAMI; HIRANO, 2012).

A inflamação estéril pode ser bastante prejudicial ao organismo porque o mecanismo estimulante pode não ser lesivo e assim sendo, fica difícil avaliar se a resposta está sendo útil ou não. As partículas estéreis, por exemplo, na maioria das vezes não são prejudiciais e em sua maioria a resposta inflamatória falha em eliminá-las. Sendo assim, a resposta imune é estimulada de forma não adequada e a inflamação consequente pode causar danos graves ao hospedeiro como doenças agudas e dano tecidual. Se não resolvida, pode ainda desencadear resposta inflamatória crônica com dano tecidual grave e fibrose, e consequente desenvolvimento de diversos tipos de doenças (ROCK et al., 2010).

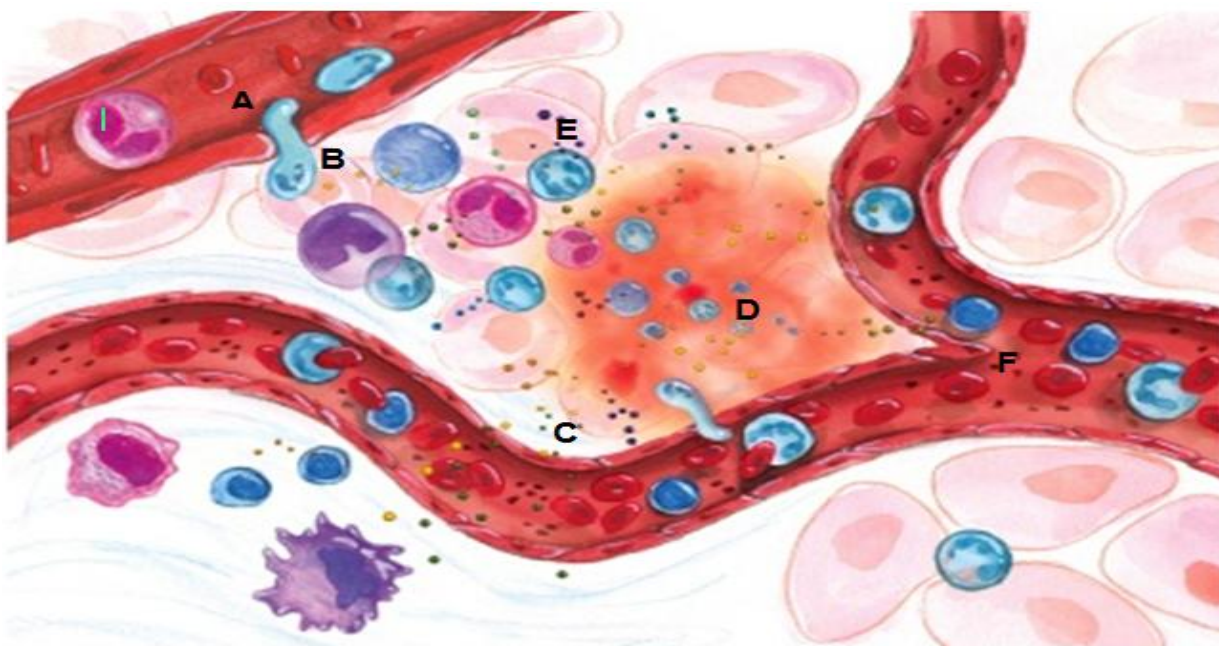
1.2 Inflamação aguda

A resposta inflamatória pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. A primeira é caracterizada pelo aumento nos níveis de citocinas, infiltração de células do sistema imunológico, em especial os neutrófilos, e a liberação dos mediadores celulares como serotonina, histamina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (FAP), leucotrienos, citocinas (ZHOU et al., 2007). A fase crônica é caracterizada pelo aumento da infiltração de macrófagos no tecido (LEE et al., 2014). É uma condição patológica onde ocorre progressiva destruição do tecido e normalmente estende-se por mais de uma semana (SHARON; ELIZABETH, 2003).

Com relação à fase aguda, os neutrófilos são os primeiros granulócitos a migrarem para o sítio inflamatório (**Figura 1**), seguidos por basófilos e eosinófilos (MANTOVANI, 2011), que desempenham papel fundamental na imunidade inata, especialmente em processos infecciosos. Tal como indicado pelo termo “granulócito”, possuem grande número de granações (vesículas intracelulares) ricas em lisozima, elastase de neutrófilos (NE), e mieloperoxidase (MPO). Quando em contato com os agentes invasores liberam estes reagentes e ainda removem os patógenos estranhos por fagocitose. Assim, os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa do organismo. Esta capacidade de resposta é facilitada pelo fato de que os neutrófilos migram rapidamente da medula para a circulação e desta para o sítio inflamatório e são facilmente atraídos por vários agentes quimiotáticos (FATTORI et al., 2016).

Para chegar ao espaço extravascular em direção ao tecido lesado, os neutrófilos passam obrigatoriamente por processos sequenciais e seletivos, dependentes da expressão de moléculas de adesão tais como selectina, integrinas e moléculas de adesão da família das imunoglobulinas (Ig) (MOGENSEN, 2009). Nas vênulas pós-capilares dos tecidos inflamados, as selectinas presentes nas células endoteliais (E e P-selectinas) interagem com ligantes presentes nos leucócitos, em especial os neutrófilos (L-selectina), fazendo com que essas células percorram com menor velocidade e rolem sobre o endotélio, possibilitando melhor adesão e apreensão dessas células ao endotélio (LANGER; CHAVAKIS, 2009). Após a adesão, os neutrófilos deixam os vasos através da interação com moléculas da família das imunoglobulinas como PECAM-1 e JAM-A chegam ao sítio inflamatório (LEY et al., 2007).

Figura 1: Representação dos eventos vasculares envolvidos na resposta inflamatória aguda.



Após à lesão ou infecção, observa-se o processo de vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular do endotélio (A), em seguida ocorre a migração de células leucocitárias (B) e são liberados diversos mediadores inflamatórios que controlam a inflamação (C), a saída de exsudato rico em proteínas de fase aguda (D) e em seguida há recrutamento de leucócitos circulantes (E), e aumento do fluxo de leucócitos nos vasos sanguíneos periféricos à lesão inflamatória (F) (INSTITUT-PASTEUR, 2015).

Os neutrófilos também podem ser maturados no próprio local da inflamação para que produzam grandes quantidades de citocinas e quimiocinas, incluindo o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1 β e IL-8), dentre outras. Isto permite o recrutamento de outras células do sistema imunológico, em particular macrófagos (NATHAN, 2006).

A resposta inflamatória aguda é normalmente iniciada mediante a participação de mediadores lipídicos, tais como eicosanóides, prostaglandinas (PG) e os leucotrienos (LT) (SAMUELSSON, 2012), e em seguida, pelo tráfego de leucócitos circulantes a partir do exsudato inflamatório, visto que os neutrófilos (PMN) são as primeiras células a migrarem para o local da inflamação, promovendo a quimiotaxia de outras células leucocitárias (MALAWISTA et al., 2008). Sabe-se ainda que os principais eventos na resolução da resposta inflamatória são a diminuição do influxo dos PMN, depuração de macrófagos e de detritos presentes (LAMMERMANN et al., 2013).

A resposta inflamatória excessiva é normalmente responsável pelo desenvolvimento de um processo mais severo, muitas vezes responsável pelo desenvolvimento de outras patologias como doenças vasculares, síndrome metabólica, doenças neurológicas, e muitos outros, e é, portanto, uma problema de saúde pública. Uma vez que a resposta inflamatória aguda é protetora, evolui para permitir a reparação de tecidos lesionados e eliminar os organismos invasores, é idealmente autolimitada e leva à completa resolução e retorno da homeostase tecidual (BUCKLEY et al., 2013).

A resposta inflamatória aguda está diretamente relacionada com a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres derivados do nitrogênio (ERNS) (MADHUSUDANA et al., 2012). Alguns estudos mostram que a maior parte da citotoxicidade celular ocorre majoritariamente durante a fase aguda da inflamação, sendo atribuída à ação deletéria de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) (GUALILLO et al., 2001).

O Fator nuclear kappa B (NF- κ B) exerce um papel importante na promoção da inflamação aguda, sendo responsável pela regulação da expressão de muitos genes envolvidos na inflamação, tais como enzimas induzíveis, quimiocinas e citocinas (BHARTI; AGGARWAL, 2002). Do mesmo modo, a resposta inflamatória é mediada por várias moléculas de sinalização e vias enzimáticas, entre as quais a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) que é importante na regulação da formação de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico (A.A) durante a inflamação (GUAN et al., 1997). Além disso, Holtmann et al., (2002) mostraram que o TNF- α e a interleucina-1 β (IL-1 β) são mediadores importantes, os quais desempenham papel crucial tanto na fase aguda como também na fase crônica. A interleucina-10 (IL-10) é conhecida como a citocina anti-inflamatória mais importante e inibe os monócitos, TNF- α derivado de macrófagos, e as interleucinas, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 (SHIN et al., 1999). Caso existam falhas na restauração do processo inflamatório agudo ou a perpetuação do agente patogênico, o processo inflamatório tende a se tornar crônico, conseqüentemente ocorrem mudanças no perfil celular como, por exemplo, a substituição dos tipos celulares de polimorfonucleadas para mononucleadas, representadas pelos macrófagos e linfócitos T (LAWRENCE; GILROY, 2007). Dessa forma, a inflamação crônica surge devido a falhas na resolução do processo inflamatório agudo (MURAKAMI; HIRANO, 2012).

1.3 Inflamação crônica

A fase crônica mostra-se mais complexa, uma vez que as causas específicas para a persistência da inflamação crônica ainda não são bem compreendidas, no entanto, múltiplos fatores desempenham papel central no desencadeamento da inflamação crônica (KANTERMAN; SADE-FELDMAN; BANİYASH, 2012). Dentre eles, a infiltração celular e seus produtos potencialmente tóxicos, a permanência dos estímulos iniciais e a incapacidade de recuperação tecidual (AGGARWAL et al., 2006). Esses fatores que podem levar à inflamação crônica são evidentes devido à resposta desencadeada por antígenos específicos, não específicos e autoimunes como em casos de patógenos persistentes ou tumores em crescimento que não poderiam ser eliminados e provocam respostas contínuas, favorecendo fatores pró-inflamatórios (BANİYASH, 2006; LAWRENCY; GILROY, 2007).

Ainda com relação ao processo de cronificação da inflamação é importante destacar a substituição de células polimorfonucleadas, encontradas predominantemente na fase inicial da resposta inflamatória, por células gigantes, mononucleadas como fibroblastos, monócitos e linfócitos (JANSSON; HENSON, 2012; TABAS; GLASS, 2013). A mudança no perfil celular parece estar diretamente relacionada à produção de interleucina 6 (IL-6). Alguns estudos mostram que a IL-6 estimula em células endoteliais a produção da proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1) e a expressão de moléculas de adesão. Sabe-se ainda que a exposição de neutrófilos também contribui para a liberação de MCP-1 e isso favorece a quimiotaxia e migração de células mononucleadas principalmente monócitos (GABAY, 2006). A partir de então, os monócitos são responsáveis pela produção do fator pró-mitogênico M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) que induz sua diferenciação em macrófagos, induzindo assim a proliferação celular (LIBBY, 2007).

Parece existir uma relação cíclica a partir do momento em que ocorre a ativação de neutrófilos e macrófagos, pois os mesmos sintetizam e secretam vários mediadores pró-inflamatórios, dentre os mais comuns tem-se as interleucinas IL-1, IL-6, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), os eicosanóides, leucotrienos (LTB₄), prostaglandinas (PGE₂) e tromboxanos (TXB₂), bem como outras moléculas efetoras como, por exemplo, óxido nítrico (NO) e peróxido de oxigênio (H₂O₂). Esse

conjunto de fatores parece favorecer a perpetuação do processo inflamatório (NAKAMURA et al., 2003).

Outra alteração relacionada à inflamação crônica é o remodelamento da matriz extracelular (MEC). Estudos *in vitro* têm demonstrado que metaloproteinases (MMPs) podem clivar uma grande quantidade de substratos, incluindo macromoléculas da matriz, colágeno intersticial, fibronectina, laminina e a proteoglicana, entre outras (SOUZA; LINE, 2002). As MMPs são capazes de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais e isso nos leva a acreditar que estas podem degradar substratos da MEC para permitir a passagem de células infiltrantes, favorecendo a manutenção do estado inflamatório (SOROKIN, 2010).

Outros elementos que participam da instalação e manutenção da resposta inflamatória crônica é o ácido úrico e os radicais livres. A presença do ácido úrico no organismo caracteriza uma situação clínica conhecida como hiperuricemia e é responsável pela precipitação de cristais de ácido úrico nas articulações, parênquima renal e túbulos renais. Esta condição clínica é conhecida como gota, e pode ser desencadeada pela aceleração no metabolismo formador do ácido úrico ou por uma excreção deficiente deste ácido pelos rins (HORDONHA, 2009). Os radicais livres EROs e ERNs também desempenham um papel impar no agravamento dos processos inflamatórios crônicos, agindo tanto diretamente como agentes lesivos, ou indiretamente induzindo a transcrição de fatores pró-inflamatórios e pró-apoptóticos (BARTOSZ, 2009; WILSON et al., 2009).

1.4 Mediadores químicos da inflamação

Os agentes inflamatórios induzem a produção de diversos mediadores que, por sua vez, alteram a funcionalidade de tecidos e órgãos, e muitos deles têm efeitos comuns sobre o sistema vascular e o recrutamento de leucócitos. Eles podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou secretados por células leucocitárias (MAJNO; JORIS, 2004). Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos, macrófagos residentes nos tecidos, mastócitos ou pelas células presentes nos tecidos locais. Alguns mediadores (tais como a histamina e serotonina) são pré-formadas e armazenadas nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Outros

são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma (MEDZHITOV, 2008).

A histamina e a serotonina estão entre as aminas mais importantes porque são os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação aguda (MACGLASHAN, 2003). As consequências de sua liberação pela desgranulação dos mastócitos podem ser bastante prejudiciais em organismos sensíveis e podem resultar em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (KUMAR et al., 2009).

A histamina atua principalmente nos receptores H1 na microcirculação, promovendo vasodilatação das arteríolas, aumento da permeabilidade vascular, indução da síntese de prostaciclina e a liberação de óxido nítrico endotelial. A permeabilidade vascular ocorre através da contração das células endoteliais, com isso ocorre abertura das junções celulares endoteliais, resultando no extravasamento plasmático (JUTEL et al., 2009).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina, resultante da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L-triptofano. Grande parte da 5-HT no organismo é encontrada nas células enterocromafins do trato gastrointestinal, sendo o restante encontrado nas plaquetas e no sistema nervoso central (SNC). Vários estudos têm mostrado sua participação na modulação da motilidade gastrointestinal, tônus vascular periférico, tônus vascular cerebral, além de exercer importante função plaquetária e na fisiopatologia de diversas desordens de humor, enxaqueca, síndrome do intestino irritável, hipertensão sistêmica e pulmonar (MOHAMMADZADEH et al., 2008). Ela estimula as terminações nervosas sensitivas para a dor e prurido. (YAMAGUCHI et al., 1999). Assim como a histamina, a serotonina induz vasoconstrição transitória, seguida de vasodilatação, que é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo o qual provoca calor e eritema (SEPIASHVILI et al., 2013).

Outros mediadores importantes são os metabólitos oriundos do ácido araquidônico (AA) derivados de fosfolípidios e dos ácidos graxos presente na membrana plasmática (FITZGERALD; PATRONO, 2001). Quando liberado da membrana o AA pode ser metabolizado por diferentes vias enzimáticas, por exemplo, a via das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), e a via da lipoxigenase. A COX-1 é expressa constitutivamente enquanto a COX-2 é pró-inflamatórias e gera um excesso de prostaglandinas pró-inflamatórias (WANG; DUBOIS, 2010). Os

metabólitos da via da COX são os prostanóides (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2 e TXA4), já os subprodutos da via da LOX são os leucotrienos (LTA4, LTB4, LTC4, LTD4) e lipoxinas (PACHER et al., 2007). Estes mediadores de uma forma geral encontram-se intrinsecamente implicados na dinâmica do processo inflamatório, que leva a eventos vasculares e celulares que, por sua vez, predispõem ao surgimento dos sinais clássicos da inflamação e/ou manifestações dolorosas (BOOTHE, 2001, CHEN YANG; GROSSER, 2013).

As enzimas ciclo-oxigenases são responsáveis pela transformação do ácido araquidônico em PGG2 e esta em PGH2, que por sua vez vão dar origem a PGD2 e PGE2 ativas (PACHER et al., 2007). Estas PGs saem da célula por transportadores específicos de prostaglandinas e exercem sua ação em famílias de receptores próprios, presentes na membrana celular. Estes receptores são denominados de EP1, EP2, EP3 e EP4 para a ligação da PGE2; DP1 – 2, para a PGD2; receptor FP, para a PGF2; IP para a PGI2; e TPa e TPh, para o TXA2 (BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

As prostaglandinas possuem vários efeitos biológicos, entre os mais importantes têm-se a quimiotaxia de leucócitos, neutrófilos e macrófagos, efeitos pirógenos e vasodilatação, elas são também responsáveis pela estimulação, migração e proliferação de fibroblastos e ainda podem aumentar a permeabilidade vascular (LEE et al., 2003).

Outro grupo de enzimas importantes são as (LOX), derivadas do AA e de origem citosólica, são formadas por três enzimas que só estão presentes em alguns tipos de células, como neutrófilos e as plaquetas, e seus metabólitos são denominados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Os leucotrienos possuem ação vasodilatadora e edematogênica (ALLER et al., 2006). O LTB4, também promove agregação e adesão dos neutrófilos no endotélio venular, gera espécies reativas de oxigênio e promove a liberação de enzimas lisossomais, além da potente atividade quimiotática (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

1.5 Estresse oxidativo

Estudos recentes mostram que a detecção das concentrações de EROs e ERNs é de primordial importância na determinação de inúmeros processos fisiológicos e patológicos (GONG et al., 2016). Trabalho recente mostra o estresse oxidativo como fator prejudicial para as células, uma vez que pode induzir danos ao DNA, oxidar ácidos graxos em lipídios, aminoácidos nas proteínas, e desativar certas enzimas e seus cofatores. Os efeitos biológicos, eventualmente, levam à destruição de tecidos (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). As EROs também têm sido associadas com várias doenças, incluindo as doenças cardiovasculares (SITI; CHANDEL; KAMSIAH, 2015), diabetes (TANGVARASITTICHAJ, 2015), câncer, entre outras (KARAASLAN; SUZEN, 2015). Nas doenças como artrite reumatoide e artrose, que ocorrem normalmente nas articulações, os radicais livres são produzidos principalmente por macrófagos e neutrófilos ativados na membrana sinovial e condrocitos (ROBERTS et al., 2010). Segundo Kovac et al., (2014), essas EROs também podem causar sérios danos em outras estruturas celulares, por exemplo, no sistema nervoso central, favorecendo quadros convulsivos e epiléticos.

O óxido nítrico (NO), um dos radicais livres mais importantes, produzido principalmente por macrófagos ativados, quando reage com oxigênio forma peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso oxidante de proteínas. O ONOO^- pode seguidamente, ser protonado na presença de hidrogênio (H^+), originando radical bastante reativo e tóxico, o hidroxil (HO^\cdot), potencializando efetivamente a ação tóxica do NO e do O^{-2} (Yen et al., 2008). Esse radical livre atua como principal efetor do processo inflamatório e participa de diversas funções importantes, dentre elas a vasodilatação, através de efeito sinérgico com a PGI_2 para relaxar células musculares lisas e permitir a passagem de células leucocitárias através do endotélio, promove a citotoxicidade contra agentes invasores, entretanto também provoca ações deletérias ao organismo, como danos teciduais, desaminação do DNA e formação de peroxinitrito (DEDON; TANNENBAUM, 2004; ROBERTS et al., 2010). As ERNs e EROs podem ainda ativar vias de sinalização nucleares para transcrição de agentes pró-inflamatórios (SALVEMINI et al., 2011; LEE; YANG, 2012).

Para reverter os efeitos prejudiciais das EROs as terapias antioxidantes são consideradas benéficas e bastante recomendadas. A ingestão de alguns alimentos

pode atuar diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar de forma indireta do sistema enzimático com função semelhante (SHAMI; MOREIRA, 2004). A literatura afirma que o estresse oxidativo pode ser causado por desequilíbrio entre a produção e remoção de EROs, que resulta no acúmulo de radicais livres nas células, ocasionado pela superprodução de EROs ou a deterioração do sistema antioxidante (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Dessa forma, é muito importante reduzir os níveis elevados das ERNs e EROs, bem como, as altas concentrações de interleucinas IL-1 e TNF- α , e isso parece ser uma terapia médica supressiva e lógica para complicações relacionadas com os processos inflamatórios (ALG et al., 2010).

Alguns autores mostram que os minerais como selênio, cobre, ferro e zinco possuem boa atividade antioxidante, as vitaminas B, C e E, e alguns fitoquímicos como flavonoides também apresentam atividade antioxidante relevante (HAMID et al., 2010, SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Embora muitas maneiras para diminuir a concentração das EROs sejam conhecidas, diversos estudos demonstraram que a suplementação com antioxidantes, muitas vezes não conseguiu impedir a progressão da doença ou ampliar a expectativa de vida dos pacientes (MENDELSON; LARRICK, 2014).

1.6 Tratamento farmacológico

A busca pelo tratamento da dor ou febre relacionada ou não ao processo inflamatório data de 400 a.C, pois, naquela época o médico grego Hipócrates prescrevia extrato da casca e das folhas do salgueiro (*Salix Alba*). No entanto, somente no século 19, o ingrediente ativo da casca do salgueiro, salicina foi identificado na Europa. Em 1860 a empresa Kolbe na Alemanha começou a produção do ácido salicílico. O ácido acetilsalicílico a forma mais palatável de ácido salicílico foi introduzido no mercado pelo laboratório Bayer no final do século XIX (VANE, 2000). No entanto, o mecanismo de ação dos agentes anti-inflamatórios e analgésicos tais como aspirina e indometacina permanecia desconhecido até o início dos anos 1960. Nessa década John Vane descobriu o mecanismo de ação da aspirina e outros medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), aumentando assim a capacidade de desenvolver novas terapias anti-inflamatórias (VANE, 1971).

O mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição da atividade das enzimas ciclo-oxigenase 1 e 2. Essas enzimas são importantes para a síntese de vários mediadores, como as PGs, formados a partir do ácido araquidônico. A COX-1 e COX-2 são enzimas bifuncionais que medeiam uma reação em que o araquidonato mais duas moléculas de oxigênio são convertidos em endoperóxido cíclico (PGG₂), em seguida o PGG₂ sofre uma redução de dois elétrons para formar prostaglandina H₂ (PGH₂) (ASAD et al., 2015). O intermediário instável PGH₂ se reorganiza espontaneamente ou é enzimaticamente convertido por enzimas específicas para PGs biologicamente ativas (SIMMONS, 2004). A regulação geral do tipo e quantidade de PG produzida numa dada célula ou tecido é determinada pelos níveis das enzimas sintase presentes no meio (CROFFORD, 2013).

Todos os AINEs são inibidores do sítio ativo da COX, mas as diferenças sutis na maneira em que os AINEs interagem e ligam ao local ativo são responsáveis por algumas das diferenças nas suas características farmacológicas. O ácido acetilsalicílico é um modificador irreversível da COX-1 e COX-2, enquanto que todos os outros AINEs são inibidores competitivos, pois competem com o ácido araquidônico pelo sítio ativo das enzimas (LLORENS et al., 2002).

O uso frequente do AAS leva ao aparecimento de vários efeitos adversos, entre os mais comuns tem-se a intolerância gastrointestinal, erosões duodenais, lesões intestinais, e o seu uso em longo prazo pode resultar em hemorragia, inflamação e perfuração de úlceras (ESCH, 2013). Esse fato fez com que ao longo dos anos muitas pesquisas buscassem novos fármacos com boa ação anti-inflamatória e efeitos adversos reduzidos, e foi neste contexto que em 1950 foi desenvolvido a fenilbutazona, um dos primeiros fármacos não salicilato, mas que também apresentou efeito adverso importante como a agranulocitose. Em meados do século XX surgiu a indometacina, também um fármaco não salicilato, com propriedade analgésica e anti-inflamatória, substituindo a fenilbutazona, e, a partir de então, vários outros fármacos com propriedades antiflogísticas foram sendo sintetizados, buscando sempre a melhor eficácia e menos efeitos adversos (MONTEIRO et al., 2008).

Na década de 90 surge outra classe de fármacos com atividade anti-inflamatória promissora, são os COXIBES. Embora esses fármacos apresentassem boa atividade anti-inflamatória por inibir seletivamente a COX-2, muitos desses medicamentos não se mantiveram no mercado devido aos efeitos adversos severos

no sistema cardiovascular (aumento do risco de trombose), renal, e doenças hepáticas graves (EMA, 2004; ANTMAN et al., 2007).

Mesmo diante de inúmeras pesquisas, os medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de doenças inflamatórias ainda apresentam eficácia limitada e possuem efeitos adversos que restringem sua utilização (VIEIRA, 2014).

Outra classe terapêutica bastante usada como anti-inflamatórios são os corticoides, os mesmos são utilizados para a redução da inflamação numa ampla variedade de doenças, tais como doenças reumáticas, doenças alérgicas e doenças autoimunes em geral (SCHAFER-KORTING, 2005). Os corticoides são fármacos de escolha para o tratamento de uma gama de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, como por exemplo a doença de Crohn ou colite ulcerativa, onde a terapia busca entre os efeitos a regulação negativa da expressão de múltiplas citocinas e quimiocinas, diminuição da expressão de moléculas de adesão e a diminuição da expressão de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ciclo-oxigenase 2(COX-2) (FIOCCH, 2002; ROGLER, 2010).

No entanto, esses fármacos apresentam vários efeitos adversos, entre os mais comuns tem-se a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), reduzindo a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), através de retroalimentação negativa, que, por sua vez, conduz a uma secreção de cortisol reduzida pela glândula suprarrenal; osteoporose, alterações na densidade mineral óssea; retardo do crescimento em crianças; catarata e glaucoma ou ainda lesões gástricas e toxicidade renal grave (BARNES; PEDERSEN, 1993, SINGH et al., 2016).

Tais efeitos representam importante limitação ao uso desses fármacos, sendo assim, é necessário que as pesquisas continuem na busca por alternativas mais eficazes e seguras no tratamento da inflamação (MISHRA; TIWARI, 2011).

Na última década, a utilização de plantas medicinais tem aumentado substancialmente, seja como agentes utilizados na medicina tradicional ou como matéria prima para a produção de suplementos dietéticos, tanto nas culturas ocidentais e asiáticas (SPONCHIADO et al, 2016). Além disso, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) de 70-80% da população mundial depende exclusivamente de ervas para seus cuidados de saúde primários (MUHAMMAD et al., 2011). Apesar do grande desenvolvimento de métodos para a síntese de produtos farmacêuticos, as plantas medicinais ainda representam importantes fontes de novas identidades moleculares, principalmente devido ao fato de que as plantas

podem sintetizar e produzir constituintes que são difíceis de obter através de síntese química. Os compostos oriundos de fontes naturais também podem servir como protótipos para a síntese de novos medicamentos com atividades biológicas e terapêuticas semelhantes, ou ser ligeiramente modificados de modo a torná-los mais eficazes ou menos tóxicos (REGNER et al., 2011).

1.7 Plantas medicinais

Desde os primórdios da humanidade e até mesmo nas escrituras sagradas existem relatos importantes sobre os recursos naturais para a promoção da saúde. Por exemplo, Eclesiástico 39, 4, diz que o “Senhor produziu da terra os medicamentos; e o homem sensato não os desprezará”, sendo assim, o homem sempre recorreu à natureza para aprimorar seus conhecimentos, a fim de melhorar sua capacidade de alimentação, vestimentas, fertilizantes, fragrâncias, e medicamentos, especialmente através do uso de plantas medicinais (GURIB-FAKIM, 2006).

De uma forma mais ampla, a flora pode ser utilizada para vários fins; como alimentícios, uso de suas fibras, construção de casas, materiais, transporte, usos diversos como a fabricação de ferramentas de trabalho, brinquedos, e finalmente para o uso medicinal (ALLEN, 2012).

Os primeiros registros, escritos em tábuas de argila em cuneiforme, são da Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 a.C; esses relatos destacam o uso de substâncias como os óleos de *Cedrela fissilis* Vell, *Cupressus sempervirens* L, *Glycyrrhiza glabra* L, os quais ainda estão em uso atualmente para o tratamento de agravos como tosses, resfriados, infecções parasitárias e inflamação (GURIB-FAKIM, 2006).

Historicamente, a relevância do uso das plantas na medicina medieval fica clara quando se leva em conta documentos da população judia do Cairo por volta do século 12. Em uma lista de plantas existente na época constavam cerca de 170 espécies vegetais, o que corresponde em média a 81% das drogas sugeridas para uso. Por outro lado, as drogas de origem inorgânica totalizavam algo em torno de 10%, as drogas de origem animal ficavam apenas em 9%. Esses percentuais de utilização mostram o uso ancestral da flora pelas comunidades judias, registrado no

Talmud, no qual 70 das 400 espécies de plantas citadas têm indicação medicinal (LEV, 2007).

No século XV, a Europa Medieval já tinha centralizado muitos dos seus conhecimentos médicos, sendo a Ordem Beneditina, a de maior importância na época, a mesma era regida pela *Regula Benedicti*, que a partir daí passaram a contar com boticas, enfermarias e jardins botânicos (DIAS, 2005; MEDEIROS, 2009).

Ao longo do Século XVI, os monges através da experimentação e observação dos resultados de novos tratamentos, incluindo as plantas, passaram a ampliar os conhecimentos greco-latinos contidos nos trabalhos de Theophrastus, Plínio, Dioscórides e Galeno, adicionando as mesmas ilustrações e informações mais atualizadas (BUENZ, 2004). A partir de então, os beneditinos passaram a ter as plantas medicinais como fontes terapêuticas e reconhecer suas propriedades medicinais (CUNHA, 2005).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais antecede o Período Colonial, pois era uma prática rotineira de diversas tribos indígenas na era pré-colonial (WALKER, 2013). Na carta de Caminha enviada a Portugal logo após a descoberta do Brasil, existiam relatos de algumas espécies vegetais, dentre estas, urucum - *Bixa orellana* L. (FILGUEIRA; PEIXOTO, 2002). Pedro Álvares Cabral, observou entre os nativos o uso de produtos de origem vegetal para diversos fins, dentre eles, alimentação, tratamento de doenças e finalidades cosméticas. Em seguida, Gabriel Soares de Souza em seu “Tratado Descritivo do Brasil” de 1587, denomina os produtos empregados na medicina indígena como “árvores e ervas da virtude” (WALKER, 2013).

Um momento importante que contribuiu para o fortalecimento do uso das plantas medicinais no Brasil foi a chegada dos jesuítas, pois os mesmos não ficavam limitados apenas à catequese, e atuavam também no tratamento e curas de diversas doenças, assim os jesuítas podem ser considerados pioneiros na elaboração da primeira farmacopeia brasileira (POLLETO; WELTER, 2011).

A Família Real portuguesa ao chegar ao Brasil promoveu a abertura dos portos, fortalecendo o comércio e permitiu que outros povos, dentre eles alguns naturalistas, chegassem ao Brasil. Dentre os naturalistas que se dedicaram ao estudo do Brasil, podemos destacar o médico e botânico Karl Friedrich Philipp Von Martius, responsável em organizar e realizar a primeira expedição bem sucedida,

tendo como objetivo o estudo científico da biodiversidade vegetal brasileira (PINTO et al., 2002). Outras expedições importantes foram conduzidas por Alexander Von Humboldt, Aimeé Bonpland, Auguste de Saint-Hilaire, Johann Baptiste Von Spix, Frei José Mariano da Conceição Velloso e Francisco Freire Allemão. Tais esforços resultaram em varias produções científicas, abrangendo a descrição de espécies medicinais da flora, suas indicações terapêuticas e o seu modo de uso (SCALCO et al., 2010).

Em meados do século XX, o processo crescente de industrialização e produção de drogas sintéticas fez com que houvesse uma diminuição do uso de plantas medicinais pela população brasileira (BRUNNING; MOSEGUI; VIANA, 2012). Esse decréscimo foi relacionado não apenas a uma desvalorização da cultura popular, mas também aos interesses econômicos da própria indústria farmacêutica (FIGUEIREDO; GURGEL; GURGEL JÚNIOR, 2014). Mesmo assim, a utilização de plantas bioativas entrou em ascensão na segunda metade do século XX nas zonas urbanas, em especial entre os jovens. Esse fato pode estar relacionado aos movimentos urbanos existentes na época, com destaque ao movimento denominado “contracultura” existente na segunda metade do século XX. Esse movimento marcou a volta das praticas terapêuticas tradicionais no final do século XX, precisamente nos anos 80, ocorreu uma revalorização dos recursos terapêuticos tradicionais. Atualmente, o uso de plantas medicinais pode ser visto nos grandes centros urbanos do Brasil, onde existem vários estabelecimentos comerciais destinados à venda de produtos de origem natural, ou ainda a figura do raizeiro, presente nas feiras livres (LUZ, 2005).

A diversidade existente no Brasil seja de caráter biológico, socioeconômico, étnico e cultural favoreceu a criação de sistemas de conhecimento terapêuticos, cuja aceitabilidade pela população é alta. Seja no ambiente urbano ou rural, as plantas medicinais são utilizadas como alternativa terapêutica principalmente para as populações mais carentes, que possuem acesso limitado aos fármacos sintéticos (ALVES; SILVA; ALVES, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais são todas aquelas que contêm, em um ou mais de seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com propósitos terapêuticos ou que sejam precursoras de semissíntese químico-farmacêutica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Assim, as infusões, conhecidas popularmente como chás, os pós, as tinturas e outras formas

de preparações a partir de determinadas partes das plantas medicinais são utilizadas para tratamento das mais diversas enfermidades (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Ultimamente alguns estudos vêm sendo realizados com o intuito de corroborar com as informações populares alusivas ao uso de plantas medicinais. Podemos mencionar atualmente o interesse dos cientistas da indústria farmacêutica no desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e, dessa forma, aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias oriundas de plantas (GURIB-FAKIM, 2006, SPONCHIADO et al., 2016).

Nos últimos anos a demanda por plantas medicinais tem aumentado por várias razões, dentre elas destacam-se os efeitos colaterais dos fármacos industrializados, que têm motivado os seres humanos a usar produtos naturais, e o alto custo dos medicamentos sintéticos (PHONDANI, 2010).

As plantas produzem uma grande variedade de metabolitos secundários, muitos dos quais funcionam como aleloquímico ou substâncias de sinalização para atrair insetos polinizadores e animais que realizam as dispersões de frutas. Sua função principal é a defesa química contra herbívoros, microrganismos e plantas competitivas. Mais de 22.000 metabólitos secundários contendo nitrogênio foram descritos até agora em plantas, destes, 21.000 são alcalóides seguidos de amins, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (WINK, 2016).

Neste contexto as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para pesquisas científicas nesta área. Exemplos de princípios bioativos isolados de espécies vegetais, tais como flavonoides, terpenóides, cumarinas e alcaloides são reportados por suas significativas atividades na modulação de mediadores pró-inflamatórios (TALHOUK et al., 2007).

1.8 Alcaloides indólicos

Os metabolitos primários, como aminoácidos, ácidos orgânicos e hidratos de carbono, são essenciais para a vida do vegetal e existem em todas as plantas (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2011). Já os metabólitos secundários não estão diretamente envolvidos no ciclo de vida, mas ajudam as plantas nas mais diversas funções, como adaptativas e protetoras, favorecendo a sobrevivência e propagação da espécie, tais como: proteção contra agentes patogênicos como vírus, micoplasma, bactérias e fungos, contra predadores, insetos e mamíferos, contra certas plantas competidoras e os mais diversos estresses externos como radiação ultravioleta e ozônio, podendo ainda exercer outra função importante como atrair diversas espécies polinizadoras e dispersoras de sementes (SÁ et al., 2014). Assim, os metabólitos secundários se relacionam geralmente a funções ecológicas (LEE et al., 2013). Como citado anteriormente, os alcaloides fazem parte de uma vasta classe de metabólitos secundários encontrados em plantas e devido à sua capacidade de exercer atividades farmacológicas especialmente em mamíferos, os alcaloides têm sido estudados há mais de 4 mil anos, mas, apenas no século 19 foram isolados alguns exemplares como a morfina, atropina, efedrina, reserpina, dentre outros com atividades terapêuticas, possibilitando a reintrodução de inúmeros fármacos no tratamento das mais diversas doenças (TREASE; EVANS, 2009, HANOSOVÁ et al., 2015).

Formados a partir do triptofano, um ácido aminado, aromático que contém um sistema de anel indólico, originado na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico, podem atuar como precursores de uma grande variedade de outros alcaloides além dos indólicos, passando por rearranjos que promovem a conversão do sistema de anel indólico em quinolínic (SOTTOMAYOR et al., 2004).

O núcleo indólico (**Figura 2**) é um dos mais bioativos na natureza (ALVES, 2009), faz parte de muitas moléculas naturais e sintéticas com importantes atividades biológicas (KAUSHIK et al., 2013), como por exemplo, anti-inflamatória, antitumoral, analgésica e antipirética (YADAV et al., 2010). Na prática médica, existem várias substâncias em uso, cuja estrutura básica é o grupamento indólico, como por exemplo, a ergometrina, que induz a contração da musculatura uterina, a ioimbina, um antagonista do receptor alfa-2 adrenérgico, a reserpina que quando

associada ao diurético é efetiva na prevenção de retenção de sódio e formação de edema (SCHRIPSEMA et al., 2004).

A indometacina (Ácido [1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-3-indolil] acético) (**Figura 3**) é um anti-inflamatório não esteroide, derivado do ácido indol acético (VEIGA et al., 2005). Foi introduzida no mercado em 1965 para o tratamento de várias doenças inflamatórias. A indometacina é um fármaco que possui alguns efeitos indesejáveis, principalmente no trato gastrointestinal, mas é considerado muito eficaz. Sua ação farmacológica se dá pelo bloqueio das enzimas COX-1 e COX-2, impedindo a biossíntese das prostaglandinas (BORNE, 2008). Possui similaridade estrutural com alguns derivados indólicos endógenos como o triptofano, serotonina e triptamina (FERNANDES et al., 2004).

Assim, devido à sua excepcional atividade biológica, o grupamento indólico, formado por um anel benzenico, e um anel de pirrol participa, ainda, como intermediário chave na síntese de substâncias com estrutura aminoalquil ou um grupo carboxiaril de grande interesse farmacológico (GUTIERREZ, 2005)

O anel pirrol é um heterociclo muito importante, foi descoberto há cerca de 150 anos. O mesmo se apresenta como estrutura básica de vários produtos naturais, entre eles destacam-se os alcalóides e varias substâncias sintéticas com atividades biológicas, por exemplo, atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, citotóxica, antioxidante, antitumoral, imunomoduladora e inibidora de citocinas (ATTANASI et al., 2008; DAVIS et al., 2008; FAN et al., 2008)

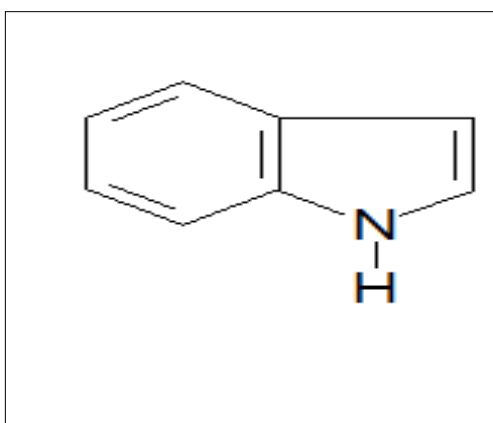


Figura 2: Núcleo indólico. Adaptada (ÖLGEN, 2002) (2,3-Benzopirrol, cetol,1-benzazol)

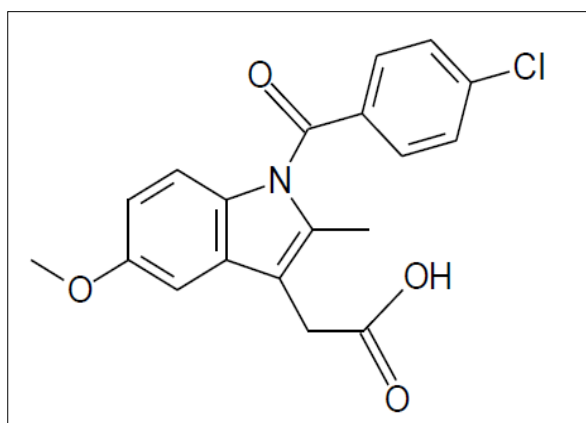


Figura 3: Indometacina. Adaptada (KIM; YEO 2016). (Ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético).

Dentre os derivados com núcleo indólico destacam-se os benzoiltriptamínicos, cujas estruturas estão relacionadas com a N-benzoiltriptamina (**Figura 4**), previamente isolada da espécie *Myrtopsis myrtoidea* (Baill.) Guillaumin, uma planta da família Rutaceae (HIFNAWAY, 1957). Dentre esses derivados incluem-se o N-N-dimetiltriptamina e o 5-metoxi-NN-dimetiltriptamina, os quais possuem atividade psicotomimética (SHEN et al., 2010; XI et al., 2016) e o N-saliciloiltriptamina (**Figura 5**) ou (2-Hidroxi-N-[2-(1H-indol-3-il) etil] benzamida) que apresentou atividade anticonvulsivante, hipnótico e relaxante muscular (OLIVEIRA, 2001). No entanto, não foi encontrado na literatura trabalho que mostre a atividade anti-inflamatória da substância em estudo.

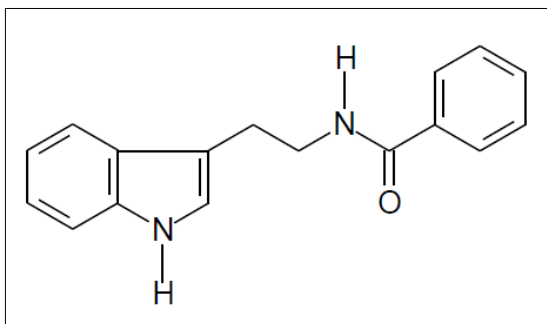


Figura 4: Estrutura da N-benzoiltriptamina (NBT)

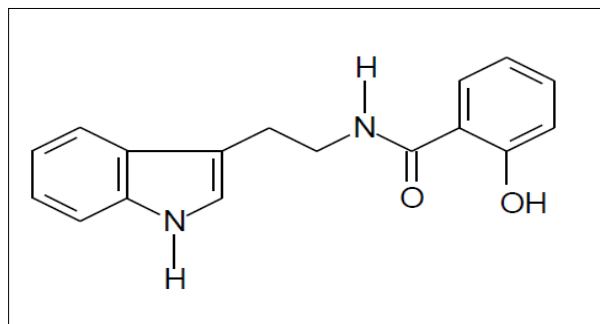


Figura 5: Estrutura da N-Saliciloiltriptamina (NST)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade anti-inflamatória do derivado benzoiltriptaminico N-saliciloiltriptamina (NST) e determinar possíveis mecanismos de ação.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o efeito antiedematogênico do NST no edema de pata induzido por carragenina em ratos.
- ✓ Avaliar a ação antiedematogênica do NST nos edemas de pata induzidos por dextrana, (dext), composto 48/80, (comp 48/80) histamina, (hist) serotonina, (5-HT) capsaicina (caps) e prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos.
- ✓ Investigar a atividade anti-inflamatória do NST no modelo de desgranulação mastocitária *ex vivo* em ratos.
- ✓ Estudar o efeito anti-inflamatório do NST sobre o número de leucócitos (contagem total e diferencial) no exsudato de peritonite induzida por carragenina em camundongos.
- ✓ Avaliar a concentração de proteínas totais no exsudato da peritonite induzida por carragenina em camundongos tratados com NST.
- ✓ Averiguar a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e catalase (CAT); e as concentrações de oxido nitrito e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no exsudato peritoneal induzido por carragenina em camundongos tratados com NST.
- ✓ Investigar a atuação do NST sobre a incapacitação articular induzida por carragenina em ratos.
- ✓ Determinar o efeito do NST sobre o edema, a dor periférica e a migração de leucócitos em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico (ácido úrico) em ratos.
- ✓ Avaliar o efeito do NST sobre a coordenação motora e capacidade exploratória nos testes do rota-rod e campo aberto em camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas, reagentes, soluções e equipamentos

Carragenina, dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, capsaicina e prostaglandina (Sigma, EUA), indometacina (Indocid[®]), Lexotan (Rivotril[®]) cetotifeno, Tween 80 (Sigma, EUA), solução de Turk, NaCl 0,9%, água destilada, bicarbonato de sódio (MERCK, Brasil), ácido acético (Sigma, EUA), L-metionina (Sigma, EUA), Triton X-100 (Sigma, EUA), cloreto de hidroxilamina (Sigma, EUA), EDTA, riboflavina (Sigma, EUA), reagente de Griess (Sigma, EUA), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma, EUA), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Fluka, EUA), diazepam (Sigma, EUA), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma, EUA), o-dianisidina (Sigma, EUA), fosfato de sódio (Merck, Alemanha), fosfato de potássio (Merck, Alemanha), sulfato de zinco (Merck, Alemanha), peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha), Tris base (Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (Merck, Alemanha), ácido tricloroacético (Merck, Alemanha), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Merck, Alemanha), NaNO₂ (Sigma, EUA),

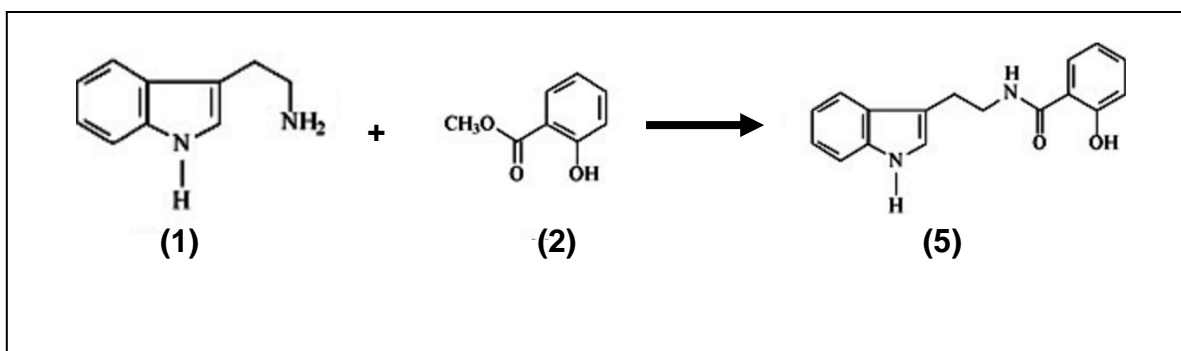
Paquímetro digital (Pantec[®]), Incapacitômetro (Insight[®]), pHmetro (Tecnal[®]), Autoclave (Primatec[®]) Balança analítica (Shimadzu[®]), balança eletrônica (Toledo), câmara de Neubauer (Optik Labor), analisador bioquímico Labtest[®], sonicador (Marconi[®]) pipetas automáticas, (Eppendorf), agitador de tubos vortex (AP56 Phoenix), microscópio ótico, centrífuga, microcentrífuga, banho-maria, leitor de placa (BioTek EL800), espectrofotômetro 40 UV-Vis, câmera fotográfica, campo aberto (Insight[®]), rota-rod (Insight[®]).

3.2 Obtenção do N-Saliciloilriptamina, 2-hidroxi-N-[2-(1H-indol-3-il) etil] benzamida (NST)

O N-Saliciloilriptamina 2-Hidroxi-N-[2-(1H-indol-3-il) etil] benzamida foi obtido no laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob responsabilidade do professor Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez que nos cedeu gentilmente a molécula. Os detalhes da metodologia de obtenção e caracterização química do NST estão disponíveis no trabalho de dissertação intitulado “Estudo químico e efeitos psicológicos de substâncias indólicas” e no artigo

“Synthesis and structural characterization of N-benzoyl-tryptamine and Its new analogue N-Salicyloyltryptamine, a potential anticonvulsant agent”. Resumidamente, para a obtenção do NST foi utilizado como matéria-prima a triptamina (1) e salicilato de metila (2), de acordo com a metodologia de Oliveira e colaboradores (2006) conforme a reação da **Figura 6**.

Figura 6: Obtenção do NST. 2-hidroxi-N-[2-(1H-indol-3-il) etil] benzamida.



Fonte: (OLIVEIRA et al., 2006)

3.3. Equipamentos

Fonte: SIGMA

As doses de 50, 100 e 200 mg/kg do NST utilizadas nos protocolos experimentais foram definidas com referência em dados da literatura (OLIVEIRA, 2001). As mesmas foram diluídas em solução contendo 5% Tween 80 em NaCl 0,9% (0,1 mL/10 g) como veículo e administrados por via intraperitoneal (i.p.)

3.4 Animais utilizados

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, adultos pesando entre 25-30g e ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar pesando entre 180 e 220g, machos e fêmeas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, a temperatura de 24 ± 1°C,

ciclos de claro e escuro de 12h com ração padrão (Labina-Purina[®]) e água *ad libitum*. Para a execução dos protocolos experimentais, os animais não foram submetidos a jejum de sólidos, os mesmos foram separados por grupos de 6 animais (n=6). Receberam NST, veículo, indometacina, cetotifeno ou diazepam por via intraperitoneal (i.p.), decorridos 30 minutos foram submetidos aos protocolos experimentais. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.), sob supervisão da médica veterinária Adeline de Andrade Carvalho (CRMV-PI 866-VP) de acordo com a Resolução N^o 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os protocolos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação com animais da Universidade Federal do Piauí (CEEAA/UFPI, Parecer N^o 082/14).

3.5 Ensaios farmacológicos

3.5.1 Toxicidade aguda em camundongos

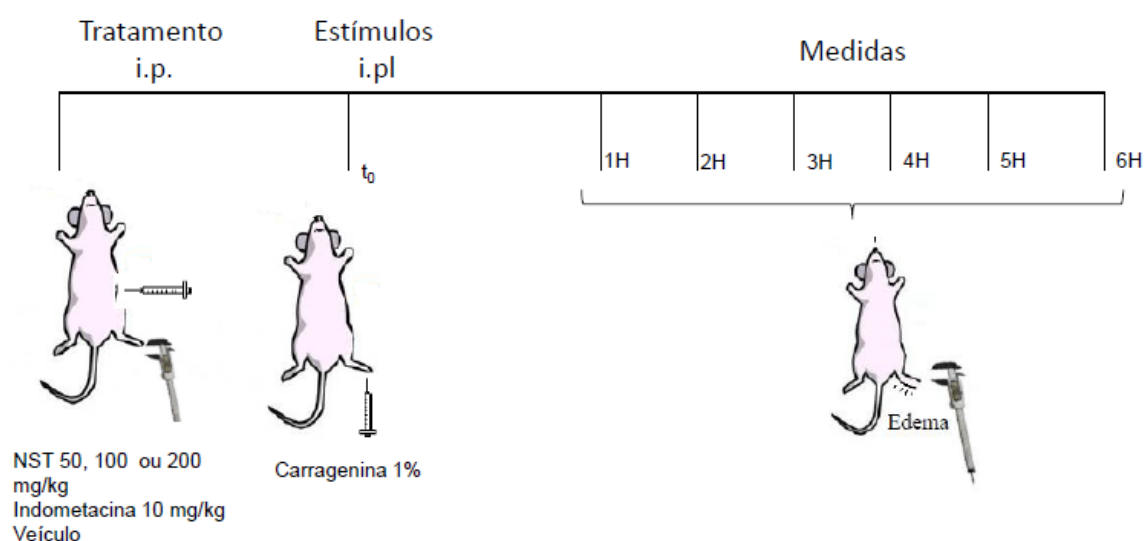
A avaliação da toxicidade foi realizada conforme o guia OECD n^o 423 (OECD, 2001), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, distribuídos em grupos de 3 animais machos e 3 fêmeas. O NST foi solubilizado em solução salina 0,9%, contendo 5% Tween 80. Em seguida, grupos diferentes de animais foram tratados por via oral e intraperitoneal com dose única de 2000 mg/kg, em volume de 10 mL/kg. Os animais foram observados por até 8 horas no primeiro dia do tratamento, em seguida foram observados diariamente por 14 dias. Os parâmetros analisados foram: estado de alerta, sedação, ptose palpebral, dispneia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, resposta ao tato, mortes, dentre outros, de acordo com o Guia para Reconhecimento e Avaliação de Sinais Clínicos.

3.5.2 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas (n=6), distribuídos em 5 grupos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com veículo, (NaCl 0,9% + 5% Tween 80), NST (50, 100 e 200 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) 30 minutos

antes da administração intraplantar (i.pl.) de carragenina (1%; 0,1 mL) na pata traseira direita (região subplantar). A espessura das patas foi registrada por paquímetro digital (Pantec®) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 5 e 6 h) após a administração de carragenina (**Figura 7**). O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre a espessura final e a espessura inicial da pata (WINTER et al., 1962).

Figura 7: Esquema da metodologia do edema de pata induzido por carragenina.

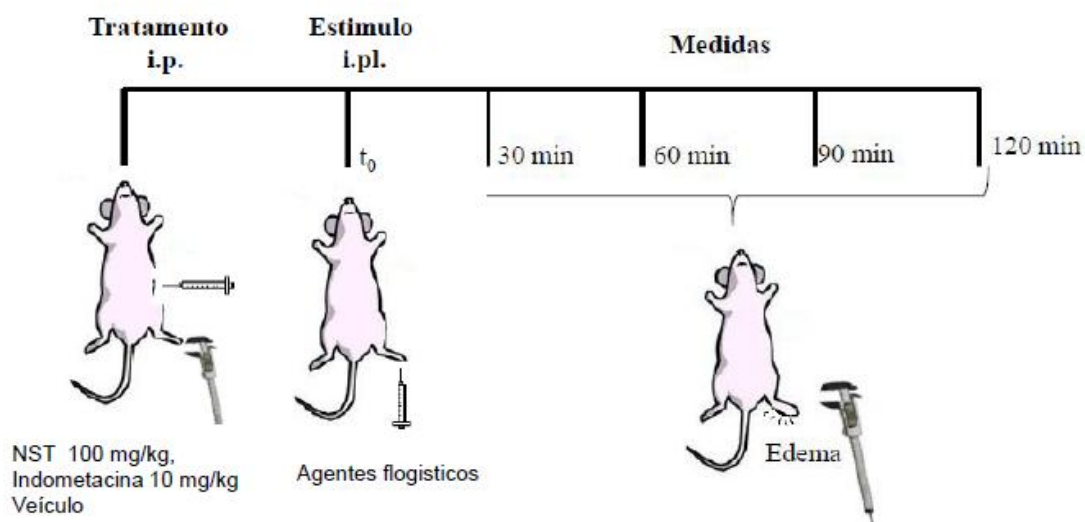


3.5.3 Ação do NST nos edemas de pata induzidos por dextrana, (dext), composto 48/80, (comp 48/80), histamina, (hist) serotonina, (5-HT), capsaicina, (caps) e prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos

Inicialmente, os animais foram divididos em grupos diferentes (n=6) e tratados (i.p.) com veículo, NST na dose de 100 mg/kg (melhor dose efetiva) ou indometacina (10 mg/kg). Após 30 minutos, foi administrado (i.pl.) 50µL de Dextrana 1%, composto 48/80 1%, Histamina 1%, serotonina 1%, capsaicina 1%, ou prostaglandina E2 0,01% na pata traseira direita. Os grupos SHAM foram tratados por (i.p.) com veículo, e 30 minutos depois receberam 50µL de solução salina estéril, (região subplantar) e serviu como grupo controle não tratado. A espessura das patas foi registrada por paquímetro digital (Pantec®), imediatamente antes da administração dos agentes flogísticos (t_0) e a cada 30 minutos por intervalo de até 2 horas (**Figura**

Figura 8: O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre a espessura final e a espessura inicial da pata (WINTER et al., 1962).

Figura 8: Esquema da metodologia do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.



3.5.4 Efeito do NST sobre a desgranulação de mastócitos *ex vivo* induzida pelo composto 48/80 em ratos

Os animais foram distribuídos em 6 grupos ($n=6$) em seguida tratados (i.p.) com NaCl 0,9%, veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80), NST (50, 100 e 200 mg/kg) ou cetotifeno (2 mg/kg). Após 2 h, os animais foram eutanasiados, os mesentérios retirados e colocados em tubos de ensaio contendo solução de Ringer (10 mL). Nos grupos tratados com veículo, NST e cetotifeno, a desgranulação dos mastócitos foi induzida pela incubação dos mesentérios com 100 μ L do composto 48/80 (concentração final de 0,4 μ g/mL). Ao invés do composto 48/80, no grupo que recebeu NaCl 0,9%, foi adicionado 100 μ L de água destilada.

Após 30 minutos de incubação, os mesentérios foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina 0,1%. A contagem dos mastócitos íntegros e desgranulados foi realizada em dez campos aleatórios de cada lâmina e o resultado expresso como percentagem de mastócitos desgranulados (NORTON, 1954).

3.5.5 Efeito do NST na peritonite induzida por carragenina em camundongos

Camundongos Swiss (25-30 g) foram tratados (i.p.) com veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80), NST (50, 100 e 200 mg/kg) ou indometacina (10mg/kg) e após 30 minutos receberam injeção de carragenina (0,05mL a 1%,) na cavidade peritoneal (VINEGAR et al., 1973). Após quatro horas, os animais foram eutanasiados, e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de solução PBS heparinizada (10 UI/mL) (SOUSA; FERREIRA, 1985).

Alíquota adicional do exsudato foi armazenada em *ependorfs* a -20°C para posterior análise da atividade de mieloperoxidase (MPO), catalase (Cat) NO₂⁻ e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

3.5.6 Contagem de leucócitos total e diferencial no lavado peritoneal de camundongos

Alíquota de 0,02 mL do exsudato peritoneal foi adicionada a 0,380 mL da solução TURK, para a contagem do número de leucócitos em câmara de Neubauer ao microscópio. O resultado da contagem total foi expresso como média de leucócitos totais, a contagem diferencial foi realizada contando no mínimo 100 leucócitos e diferenciando-os pelo tipo de leucócitos, utilizando para isso microscópio óptico.

3.5.7 Dosagem de proteínas no exsudato peritoneal de camundongos

A administração peritoneal de carragenina induz uma reação inflamatória local, que envolve a liberação de mediadores que promovem o aumento da permeabilidade vascular tendo como consequência o extravasamento de exsudato proteico para o interstício. Sendo assim, essas proteínas podem ser quantificadas pela utilização de Kits específicos de dosagem de proteínas totais (PINHEIRO et al., 2013). Utilizou-se reagente de biureto na metodologia para fazer o doseamento das proteínas. Este reagente é uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de cobre (CuSO₄), associada com tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O), possui coloração azul e torna-se violeta na presença de proteínas, pois as ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino,

formando um complexo de coloração violeta que é diretamente proporcional ao teor das proteínas existentes no meio (HE; ZHANG, 2011).

Após a centrifugação, foram colhidos os sobrenadantes e transferidos para cubetas específicas e colocadas no analisador bioquímico automático modelo Standard, número de série 1208.26 (Labtest[®]) para o doseamento das proteínas totais de acordo com a programação do equipamento e recomendações do fabricante.

3.5.8 Efeito do NST sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no exsudato peritoneal de camundongos

O ensaio de MPO foi baseado no método de Bradley et al. (1982), onde 400 µL do exsudato da peritonite foram centrifugados a 4000 g durante 7 minutos a 4° C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram recolhidos e adicionados a 1 mL de tampão HTAB 0,5% e pH 6,0 (brometo de hexadeciltrimetilamônio) seguida de centrifugação a 4500 g durante 10 minutos a 4°C. Dez microlitros do sobrenadante foram retirados e adicionados à placa de 96 poços com posterior acréscimo de 200 µL da solução de leitura (H₂O destilada, tampão fosfato pH 6,0, H₂O₂ a 1% e O-dianisidina 0,167 mg/mL). A atividade de MPO foi determinada por medição da alteração da absorvância a 450 nm em leitor de placa durante 5 minutos. A concentração de MPO está expressa em unidades de MPO por microlitro (MPO/µL).

3.5.9 Avaliação da atividade da catalase (CAT) no exsudato peritoneal de camundongos

Duzentos microlitros da amostra foram adicionados a 1,2 ml de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e em seguida 1 mL de solução de H₂O₂ 30 mM foi adicionado. A absorvância foi aferida em espectrofotômetro UV-Vis a 240 nm e consiste na queda de absorvância devido a degradação do H₂O₂. A absorvância foi registrada a cada 2 minutos durante 6 minutos. A catalase é expressa como µmoles de H₂O₂ decompostos/min/µL de soro (TAKAHARA et al., 1960).

3.5.10 Avaliação da concentração do nitrito (NO_2^-) no exsudato peritoneal de camundongos

Inicialmente, 200 μL do lavado peritoneal foram diluídos em água destilada (1:4 v.v.) para posterior deproteinização pela adição de 1/20 do volume de uma solução de sulfato de zinco na concentração de 300 g/L para atingir uma concentração final de 15 g/L. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 15 min a temperatura ambiente (ROMITELLI et al., 2007). Para determinação do óxido nítrico, 100 μL do sobrenadante foi pipetado numa placa de poços seguido da aplicação de 100 μL do reagente de Griess e após 10 minutos em temperatura ambiente a densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BioTek EL800), utilizando um filtro de 550 nm (GREEN; WAGNER; GLOGOWSKI et al., 1982). Os resultados estão expressos em termos de $\mu\text{Mol/mL}$ de acordo com curva-padrão obtida de solução de NaNO_2 (nitrito de sódio).

3.5.11 Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no exsudato peritoneal de camundongos

Duzentos microlitros da amostra foram adicionados a 350 μL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 μL de TBA 0,5% (dissolvido em ácido acético). Em seguida as amostras foram submetidas à fervura durante 45 minutos e imediatamente a um banho de gelo durante 15 minutos. Cinquenta microlitros de dodecil sulfato de sódio 8,1% (SDS) foram adicionados e procedeu-se com centrifugação a 12000 g durante 15 minutos a 25°C. A densidade óptica (absorbância) foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, utilizando filtros de 420, 490 e 550 nm. O valor foi expresso em nmol/mL (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

3.5.12 Avaliação do efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por carragenina em ratos

Para avaliação do grau de incapacitação articular motora do membro que recebeu carragenina, foi utilizado o modelo de incapacitação articular em ratos, descrito por Tonussi e Ferreira (1992). O sistema é formado por um tambor em aço inoxidável dividido em três baias de 10 cm cada, nas quais os animais são

posicionados. Sapatilhas metálicas foram ajustadas em ambas as patas posteriores, sendo que, apenas a sapatilha que esteve na pata posterior direita foi conectada à porta de entrada de dados do computador.

Figura 9: Incapacitômetro (Insight®)



Fonte: Arquivo pessoal

No experimento foram utilizados ratos Wistar, após ambientação de 30 minutos e imediatamente antes da indução de incapacitação por carragenina, os animais foram submetidos ao teste de incapacitação articular durante 60 segundos a uma velocidade constante de 3 rotações por minuto (RPM) e os resultados foram tomados como medida controle. Em seguida, os animais foram tratados (i.p.) com veículo, (NaCl 0,9% + 5% Tween 80), NST (50, 100 e 200 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg). Após 30 minutos os animais receberam carragenina 50 μ L (300 μ g) na região intra-articular da pata direita em ratos

As medições foram realizadas durante 60 segundos a cada hora até a sexta hora e após 24 horas. A fim de atestar que um possível efeito positivo no teste de incapacitação articular, ou seja, maior tempo de elevação da pata (TEP) tenha ocorrido em virtude da ação anti-inflamatória da substância teste e não em decorrência de ações depressoras sobre o sistema nervoso central, foram realizados

os testes de rota-rod e campo aberto com o intuito de averiguar alterações na coordenação motora e capacidade exploratória dos animais, respectivamente.

3.5.13 Efeito do NST sobre o edema, dor periférica e migração de leucócitos em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico (ácido úrico) em ratos

O modelo experimental de artrite gotosa é bastante utilizado na avaliação de novas drogas anti-inflamatórias (RASOOL; VARALAKSHMI, 2006). Cristais de urato monossódico (MSU) foram previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C, e em seguida, foram diluídos em salina 0,9% (40 mg/mL). A inflamação foi induzida no primeiro dia do experimento por injeção na região tibiotársica com (100µL de MSU) na pata traseira direita. Os animais foram tratados com salina, NST (50, 100 e 200 mg/kg i.p.) ou indometacina 10 mg/kg (i.p), 30 minutos antes da injeção de MSU. O tratamento foi repetido diariamente por um período de quatro dias.

Nesse ensaio, a incidência e a severidade da artrite foram avaliadas através da medida do volume da pata traseira direita com paquímetro (Pantec®) nos tempos 0, 4, 24, 48 e 72 h, 30 minutos depois do tratamento diário com NST. Já a dor periférica foi analisada observando o tempo de elevação das patas (TEP) utilizando incapacitômetro (Insight®) em diferentes intervalos de tempo 0, 4, 24, 48 e 72 h, também 30 minutos depois do tratamento diário com NST. Todas as medidas foram feitas por um mesmo observador. Em todos os procedimentos experimentais os animais foram treinados a caminhar no Incapacitômetro no dia anterior ao teste. Para validar o experimento, animais normais foram submetidos à marcha no incapacitômetro (TONUSSI, FERREIRA, 1992).

Posteriormente, os animais foram previamente anestesiados e eutanasiados de acordo com a legislação vigente, o material coletado foi fixado em formol a 10% e encaminhado para o laboratório de histologia e patologia da Universidade Federal do Piauí-UFPI, onde foi clivado em seções transversais e longitudinais e submetido ao processamento histológico de rotina que inclui: desidratação em uma série crescente de etanol - 70° GL a 100° GL, diafanização em xilol, e em seguida obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e logo após, foram usados para determinar o número de células que se infiltraram e

caracterizar as populações de glóbulos brancos (leucócitos) presentes no tecido (NIKI et al, 2001;. LEE et al, 2013). Todas as lâminas confeccionadas foram observadas e fotografadas com câmera digital Olympus U-TV0 5XC acoplada ao microscópio Olympus CX41.

3.5.14 Efeito do NST sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod

Por este método é possível detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção e inflamação (LAPA et al., 2003). Camundongos machos foram selecionados 24 h antes do experimento, através de uma triagem em sessões de 1 minuto de duração, sendo escolhidos os que permaneceram todo o tempo de avaliação no aparelho. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=6) e tratados com veículo (i.p), NST (200 mg/kg, i.p) ou diazepam (5 mg/kg i.p) como controle positivo. Após meia hora de administração do veículo, NST e diazepam foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, podendo o animal ser reconduzido por até três vezes após a queda e admitindo-se como tempo máximo 60 segundos.

3.5.15 Efeito do NST sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto

Este teste foi utilizado para avaliar a capacidade exploratória dos animais (LAPA, 2003). Os camundongos foram distribuídos em três grupos (n=6) e tratados com veículo (i.p), NST (200 mg/kg, i.p) ou diazepam, (5 mg/kg i.p.). Após 30 minutos, os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais com paredes transparentes. O animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após esse período, foi avaliado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal, durante um tempo de 5 minutos. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, sendo então realizada a comparação entre os grupos (BROADHURST, 1957).

3.5.16 Análise estatística

Para análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism[®] versão 6.01. Utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para comparação entre grupos com apenas uma variável independente e ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni entre grupos com mais de uma variável independente. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da toxicidade aguda do NST em camundongos

Os resultados observados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica após a administração do NST na dose de 2000 mg/kg (v.o, ou i.p.). Não foram observadas mortes e nem alterações de comportamento durante o tempo de observação de 14 dias.

4.2 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos

O pré-tratamento dos animais com NST (100 mg/kg) inibiu significativamente ($*p<0,05$) o edema de pata induzido por carragenina na primeira, terceira, quarta e quinta horas, comparado ao grupo veículo, para a segunda hora a significância foi de ($*p<0,01$), com referência ao grupo tratado com veículo (**Figura 10**). Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com NST na dose de 200 mg/kg também diminuiu significativamente ($*p<0,05$) a formação do edema na primeira hora, obtendo inibição máxima da 2ª à 5ª hora de observação ($***p<0,001$) em relação ao grupo veículo. A indometacina (10 mg/kg) inibiu de forma significativa ($*p<0,05$) a formação do edema já a partir da primeira hora e perdurou até a sexta hora ($***p<0,001$) comparativamente ao grupo veículo. O NST na dose de 50 mg/kg não apresentou inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina ($p>0,05$). No entanto, nenhuma dose do NST inibiu o edema na sexta hora ($p>0,05$) (**Tabela 2**).

Para continuar os estudos da atividade antiedematogênica do NST em camundongos foi escolhido a partir deste resultado a dose de 100 mg/kg como a dose efetiva.

Figura 10: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

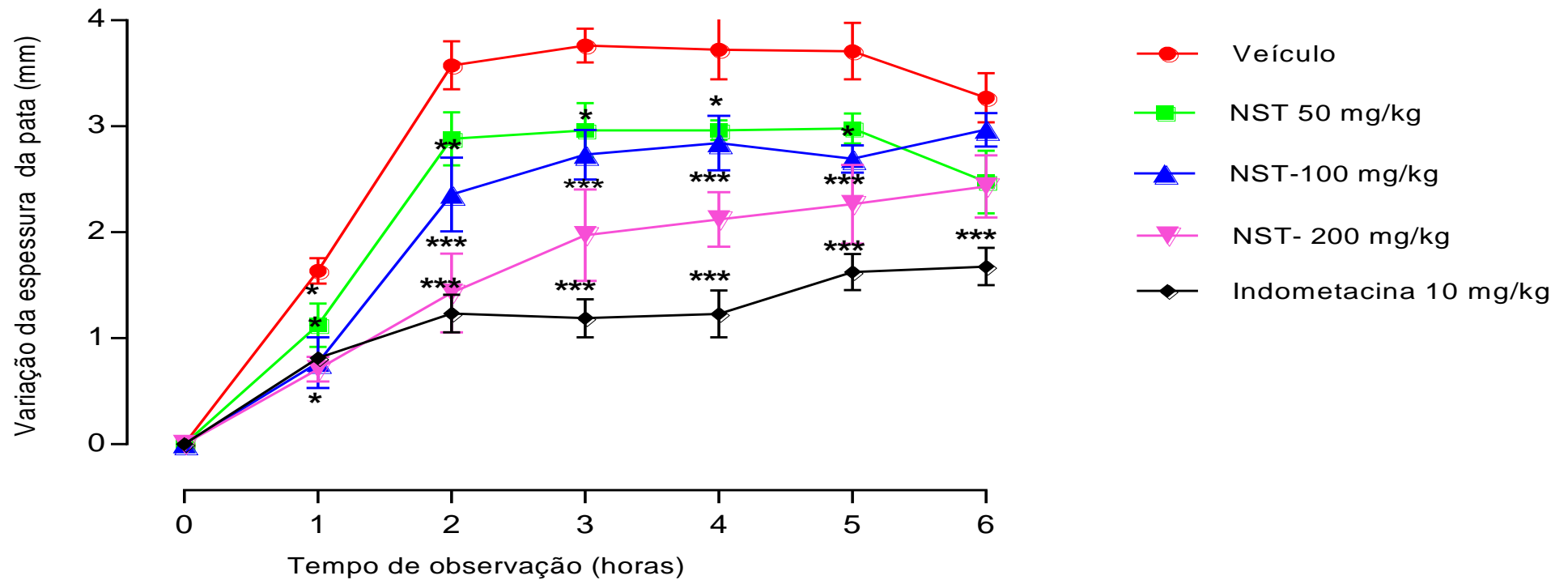


Tabela 2: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ,veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Edema de pata (mm)						
Tratamento (mg/kg, i.p.)	Intervalo de tempo					
	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Veiculo	1.63 \pm 0,12	3,58 \pm 0,23	3,76 \pm 0,16	3,72 \pm 0,28	3,71 \pm 0,26	3,27 \pm 0,23
NST (50)	1,12 \pm 0,20	2,88 \pm 0,25	3,08 \pm 0,26	2,96 \pm 0,09	2,98 \pm 0,14	2,62 \pm 0,16
NST (100)	0,86 \pm 0,24*	2,03 \pm 0,35**	2,93 \pm 0,23*	2,84 \pm 0,26*	3,07 \pm 0,26*	2,97 \pm 0,16
NST (200)	0,80 \pm 0,12*	1,43 \pm 0,37***	1,97 \pm 0,43***	1,99 \pm 0,25***	2,04 \pm 0,37 ***	2,31 \pm 0,36
Indometacina (10)	0,91 \pm 0,05*	1,23 \pm 0,18***	1,19 \pm 0,18***	1,23 \pm 0,22***	1,63 \pm 0,17***	1,68 \pm 0,17***

4.3 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg diminuiu o edema induzido por dextrana a 1% na pata traseira direita dos camundongos durante o tempo de observação. Sendo (** $p < 0,01$), para os primeiros 30, e (** $p < 0,001$) para 60, 90 minutos. Para o tempo de 120 minutos a significância foi de (* $p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas veículo (**Figura 11**). Observou-se também inibição significativa (** $p < 0,001$) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg/kg) durante o tempo de observação de 120 minutos, comparado ao grupo veículo (** $p < 0,001$) (**Tabela 3**).

Figura 11: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por dextrana (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

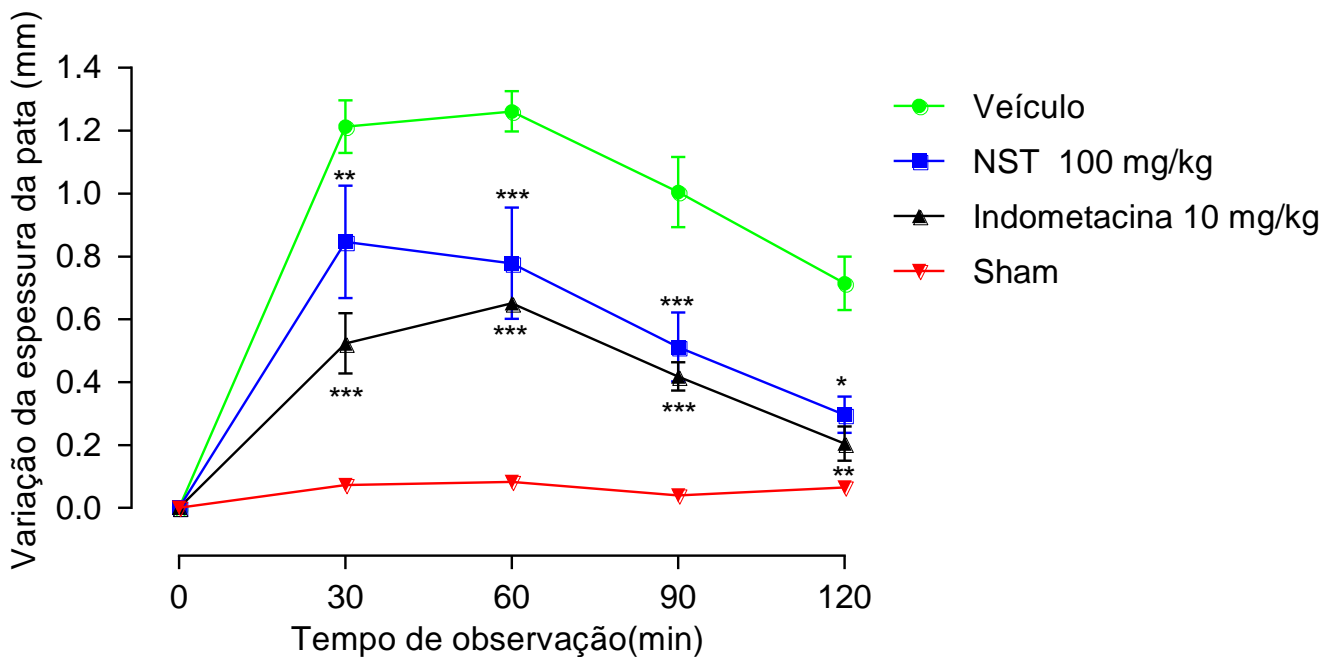


Tabela 3: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por dextrana (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Edema de pata (mm) Dextrana			
	Intervalo de tempo			
	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,07 \pm 0.01	0,08 \pm 0.01	0,04 \pm 0.01	0,06 \pm 0.01
Veículo	1,21 \pm 0.08	1,26 \pm 0.06	1,00 \pm 0.09	0,72 \pm 0.09
NST (100)	0,85 \pm 0.18**	0,78 \pm 0.11***	0,51 \pm 0.11***	0,30 \pm 0,06**
Indometacina (10)	0,52 \pm 0.10***	0,65 \pm 0.02***	0,42 \pm 0.05***	0,20 \pm 0.05**

4.4 Ação do NST sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg reduziu de forma significativa o edema de pata induzido pelo composto 48/80 a 1% durante o tempo de 30, 60 e 90 minuto (** $p < 0,001$), em 120 minutos a significância estatística foi de ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle tratado com veículo. Observou-se também diminuição significativa (** $p < 0,001$) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg/kg) durante todo tempo de observação que variou de 30 até 120 minutos (** $p < 0,001$), em relação ao grupo veículo (**Figura 12**) (**Tabela 4**).

Figura 12: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $**p<0,01$ e $***p<0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

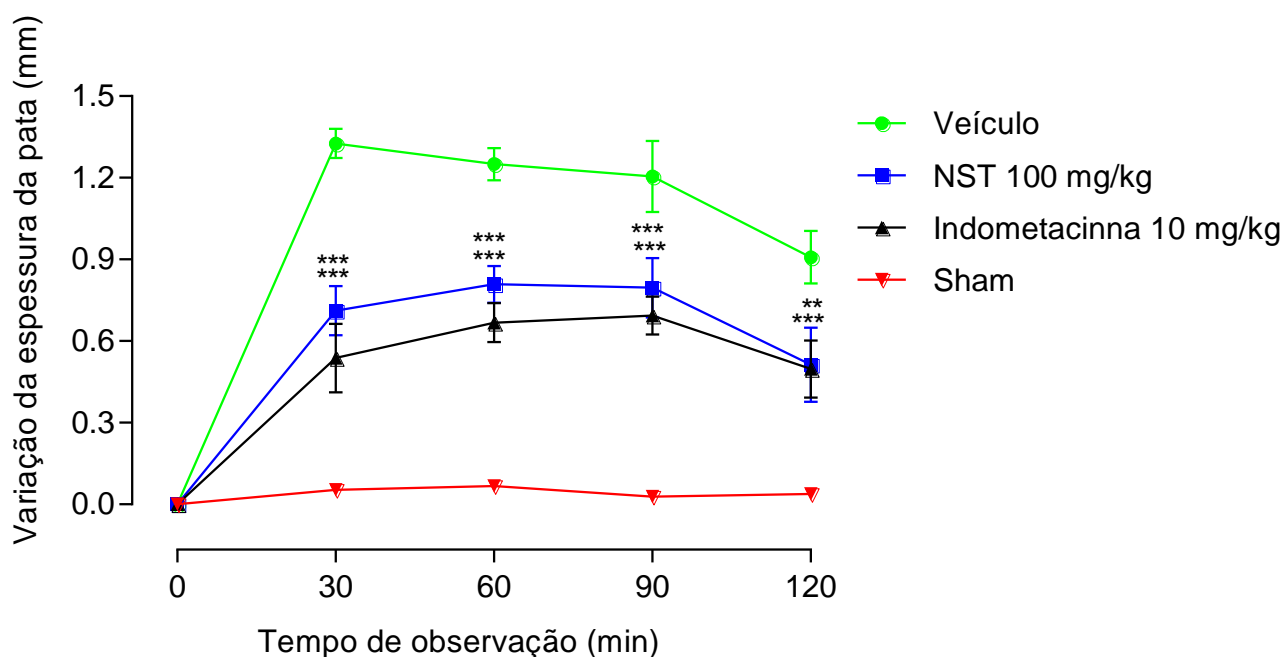


Tabela 4: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $**p<0,01$ e $***p<0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Edema de pata (mm) Composto 48/80			
	Intervalo de tempo			
	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,05 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Veículo	1,33 \pm 0,05	1,25 \pm 0,06	1,20 \pm 0,13	0,91 \pm 0,10
NST (100)	0,71 \pm 0,09***	0,81 \pm 0,07***	0,79 \pm 0,11***	0,51 \pm 0,14**
Indometacina (10)	0,54 \pm 0,13***	0,67 \pm 0,07***	0,69 \pm 0,07***	0,50 \pm 0,10***

4.5 Ação do NST sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg inibiu o edema induzido por histamina a 1% na pata traseira direita dos camundongos a partir dos primeiros 30 minutos, perdurando até os 90 minutos ($***p < 0,001$) em relação ao grupo veículo. Observou-se reversão significativa ($***p < 0,001$) do edema no grupo tratado com a droga padrão indometacina até os 90 primeiros minutos (10 mg/kg), tendo como referencia o grupo veículo (**Figura 13**) (**Tabela 5**).

Figura 13: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por histamina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongo. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

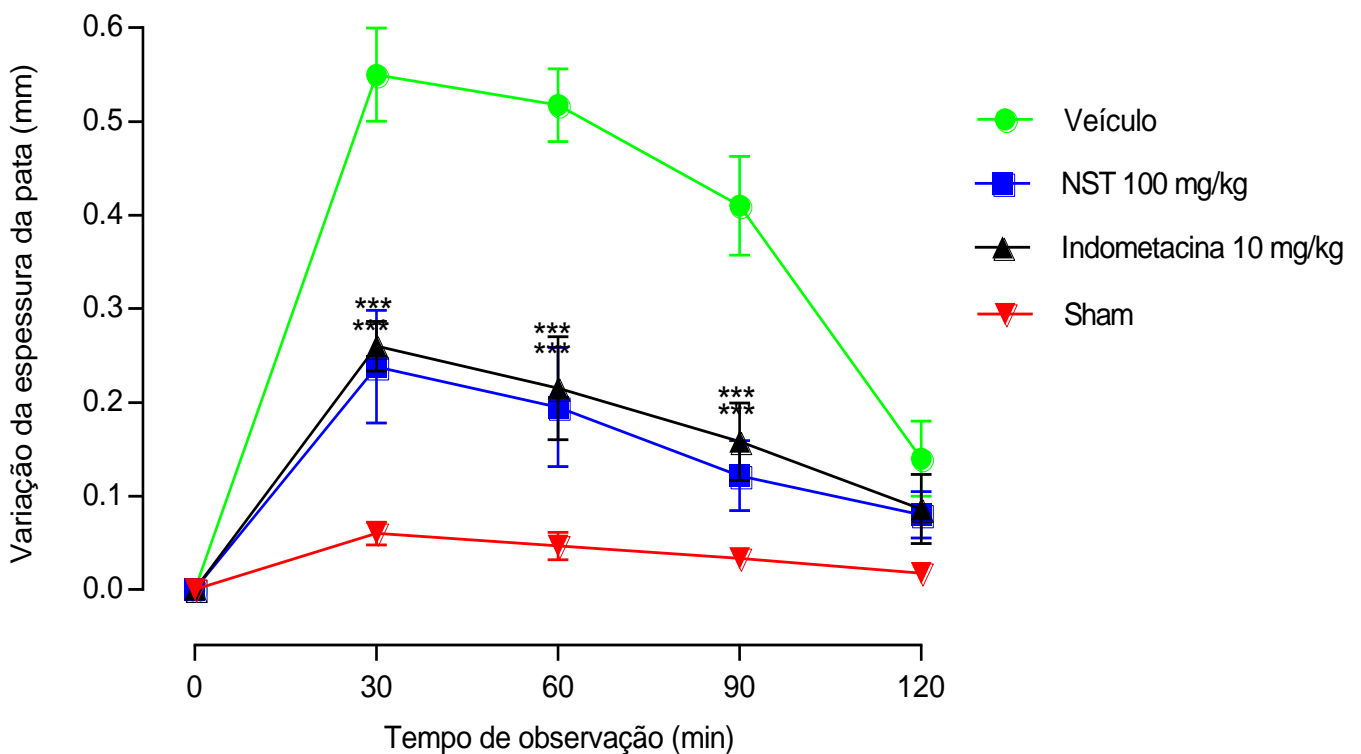


Tabela 5: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por histamina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongo. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Edema de pata (mm) Histamina			
	Intervalo de tempo			
	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,06 \pm 0.02	0,05 \pm 0.01	0,03 \pm 0.01	0,03 \pm 0.01
Veículo	0,55 \pm 0.05	0,52 \pm 0.04	0,41 \pm 0.05	0,14 \pm 0.04
NST (100)	0,24 \pm 0.06***	0,20 \pm 0.06***	0,12 \pm 0.04***	0,08 \pm 0,02
Indometacina (10)	0,26 \pm 0.03***	0,22 \pm 0.05***	0,16 \pm 0.04***	0,09 \pm 0.04

4.6 Ação do NST sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg reduziu o edema induzido por serotonina (1mg/mL), nos tempos de 30 e 60 minutos com significância de * $p < 0,05$, para 90 minutos a significância estatística foi de ** $p < 0,01$, em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas veículo. Observou-se inibição significativa (***) $p < 0,001$) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg/kg) durante os primeiros 90 minutos, em relação ao grupo veículo. No entanto, nenhuma das substâncias reverteu o edema de forma significativa na última hora de observação ($p > 0,05$) (Figura 14) e (Tabela 6).

Figura 14 - Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por serotonina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

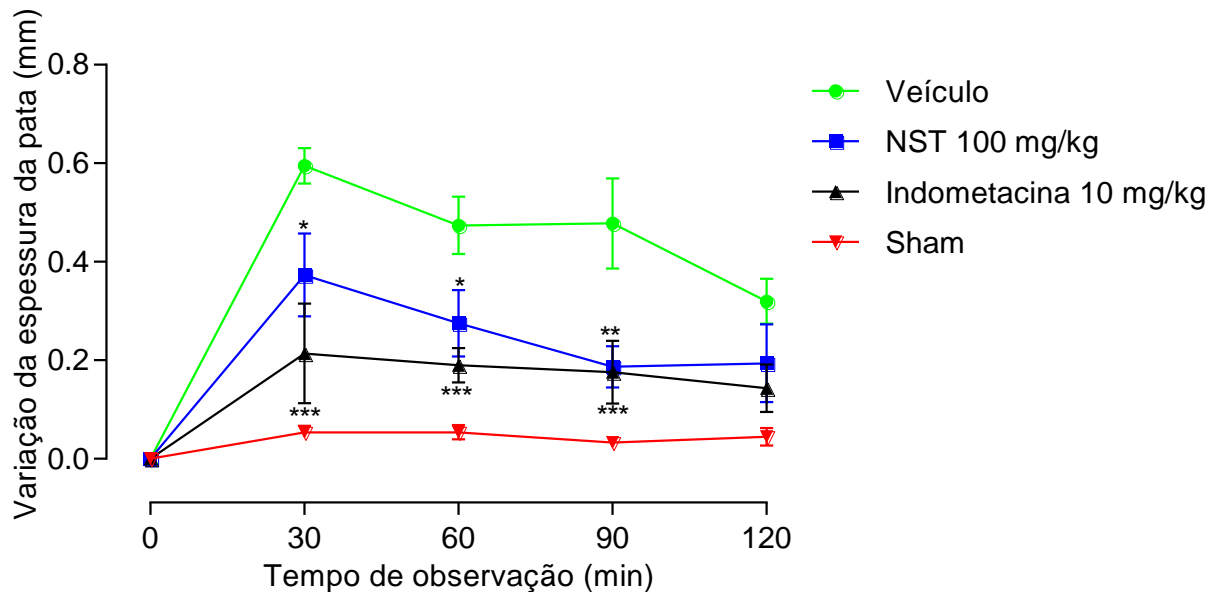


Tabela 6: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por serotonina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Edema de pata (mm) Serotonina			
	Intervalo de tempo			
	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
Veículo	0,60 \pm 0,09	0,47 \pm 0,06	0,48 \pm 0,09	0,32 \pm 0,05
NST (100)	0,37 \pm 0,08*	0,28 \pm 0,07*	0,19 \pm 0,04**	0,19 \pm 0,08
Indometacina (10)	0,21 \pm 0,10***	0,19 \pm 0,03***	0,18 \pm 0,06***	0,14 \pm 0,05

4.7 Efeito do NST sobre o edema de pata induzido por capsaicina em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg inibiu o edema induzido por capsaicina (1mg/mL) nos tempos de 30, 60 e 90 minutos ($*p<0,05$), ($***p<0,001$) ($**p<0,01$), respectivamente, em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas veículo. Houve diminuição significativa ($***p<0,001$) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg/kg) durante os primeiros 60 minutos ($***p<0,01$) e para o tempo de 90 minutos. Na ultima análise (120 minutos) não houve inibição significativa do edema em relação ao grupo veículo ($p >0,05$) (**Figura 15**) e (**Tabela 7**).

Figura 15: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por capsaicina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M $*p<0,05$ $**p<0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

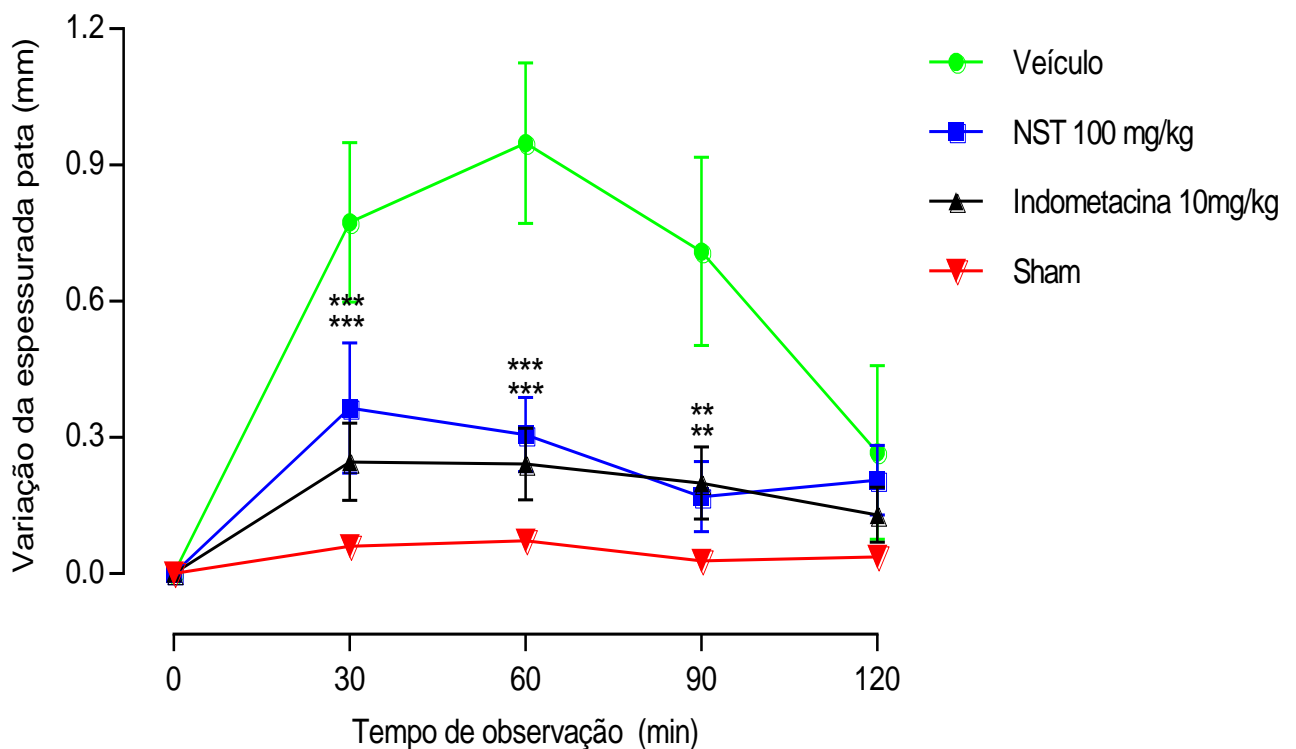


Tabela 7: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por capsaicina (1 %; 0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Edema de pata (mm) Capsaicina			
	Intervalo de tempo			
	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,06 \pm 0.01	0,07 \pm 0.02	0,03 \pm 0.01	0,04 \pm 0.01
Veículo	0,77 \pm 0.18	0,95 \pm 0.18	0,71 \pm 0.22	0,27 \pm 0.19
NST (100)	0,37 \pm 0.14***	0,31 \pm 0.08***	0,17 \pm 0.08**	0,21 \pm 0,08
Indometacina (10)	0,25 \pm 0.09***	0,24 \pm 0.08***	0,20 \pm 0.08**	0,13 \pm 0.06

4.8 Ação antiedematogênica do NST sobre o edema de pata induzido por PGE 2 em camundongos

O NST na dose de 100 mg/kg reduziu o edema induzido por PGE₂ (50 ng/50 μ L,) nos tempos de 30 e 60 minutos de observação (** $p < 0,001$), em relação ao grupo veículo. Para o tempo de 90 minutos a significância foi de (* $p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle que receberam apenas veículo. Observou-se redução significativa também do edema nos animais tratados com indometacina (10mg/kg) durante os primeiros 60 minutos (** $p < 0,001$). Para o tempo de 90 minutos a significância estatística foi de (* $p < 0,05$). No entanto, nenhuma das substâncias diminuiu o edema de forma significativa na ultima hora de observação ($p > 0,05$) (**Figura 16**) (**Tabela 8**).

Figura 16: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E2 (50 ng/0.05mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

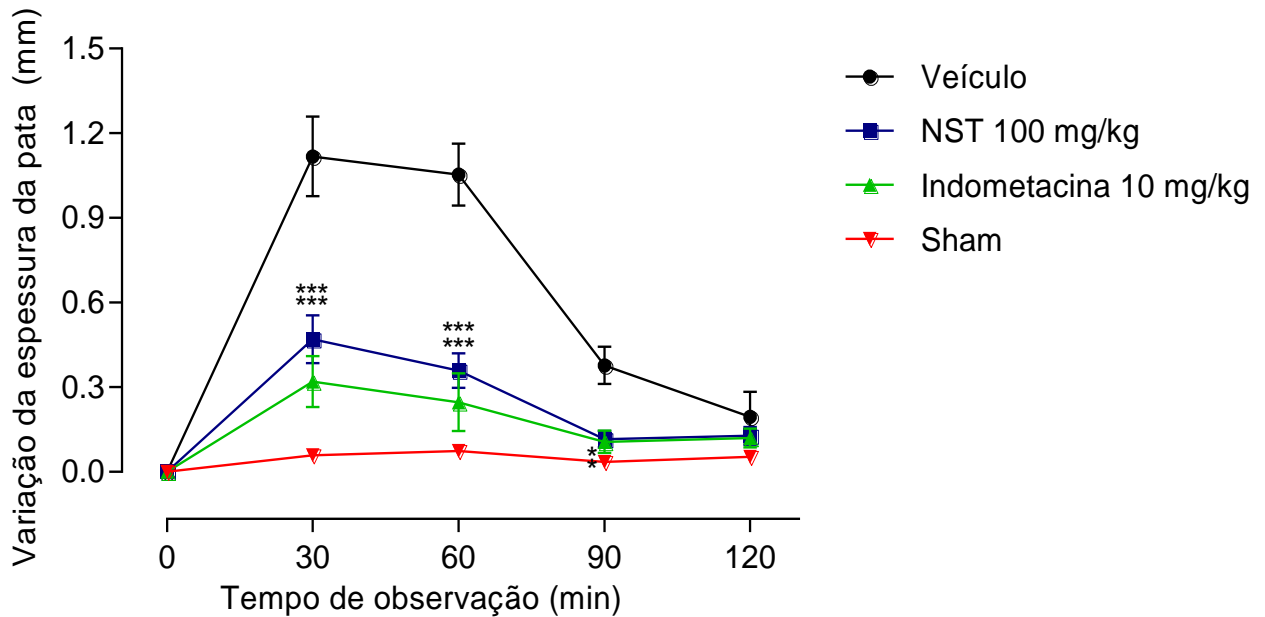


Tabela 8: Efeito do NST (100 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e da indometacina (10 mg/kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por Prostaglandinas E2 (50 ng/0,05 mL, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Edema de pata (mm) Prostaglandina E2				
Intervalo de tempo				
Tratamento (mg/kg, i.p.)	30 min	60 min	90 min	120 min
SHAM	0,06 \pm 0.01	0,07 \pm 0.01	0,04 \pm 0.01	0,05 \pm 0.01
Veículo	1,12 \pm 0.14	1,05 \pm 0.11	0,38 \pm 0.07	0,19 \pm 0.09
NST (100)	0,47 \pm 0.08**	0,36 \pm 0.06***	0,12 \pm 0.03*	0,13 \pm 0,03
Indometacina (10)	0,32 \pm 0.09***	0,25 \pm 0.10***	0,11 \pm 0.04*	0,12 \pm 0.03

4.9 Efeito do NST sobre a degranulação de mastócitos *ex vivo* induzida pelo composto 48/80 em ratos

O pré-tratamento dos animais com NST na dose de (50 mg/kg i.p.) reduziu de forma significativa (** $p < 0,01$), em 32% a desgranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 (0,4 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao grupo veículo. Da mesma forma as doses de 100 e 200 mg/kg, i.p. também restringiram significativamente (** $p < 0,001$) a desgranulação de mastócitos em 71.02% e 70.85%, respectivamente, com referência ao grupo veículo. Da mesma forma o cetotifeno (2 mg/kg, i.p.) inibiu (** $p < 0,001$) em 74.54% a desgranulação dos mastócitos quando comparados ao grupo veículo (**Figuras 17 e 18**).

Figura 17: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e cetotifeno (2 mg/kg, i.p.) sobre a desgranulação de mastócitos mesenteriais *ex vivo* induzida por composto 48/80 (0,4 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA one way e pós teste Tukey).

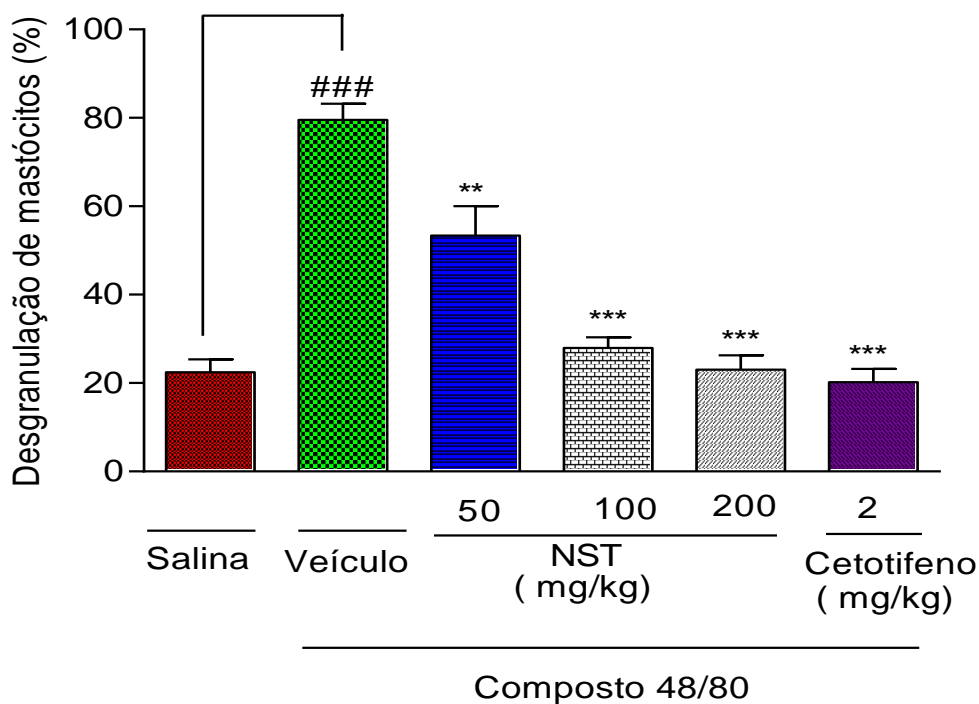


Figura 18: Microfotografia representativa do efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e cetotifeno (2 mg/kg, i.p.) na desgranulação de mastócitos mesentéricos *ex vivo* induzida pelo Composto 48/80. Os mastócitos foram obtidos de mesentérios de ratos corados com azul de toluidina 0,1% e submetidos ou não ao composto 48/80 (0,4 µg/mL); **(A)** mastócitos dos ratos tratados apenas com salina; **(B)** mastócitos dos ratos tratados com veículo (NaCl 0,9% + 5 % Tween 80, i.p.) e incubados com o composto 48/80, exibindo extensa degranulação dos mastócitos; **(C)** Mastócitos dos ratos tratados com o NST (50 mg/kg, i.p.); **(D)** mastócitos dos ratos tratados com o NST (100 mg/kg, i.p.); **(E)** mastócitos dos ratos tratados com o NST(200 mg/kg, i.p.) e **(F)** cetotifeno (2 mg/kg, i.p.) e incubados com o composto 48/80 mostrando inibição da desgranulação (alguns campos ampliados).

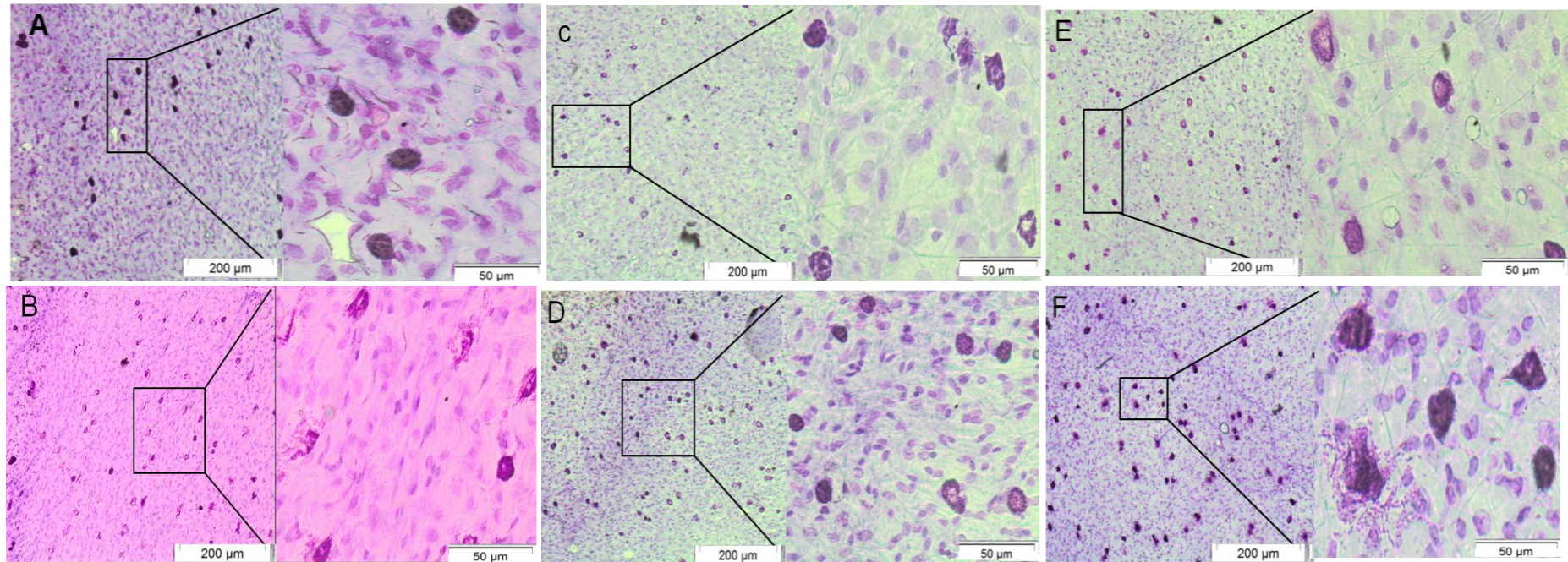


Foto: Arquivo pessoal

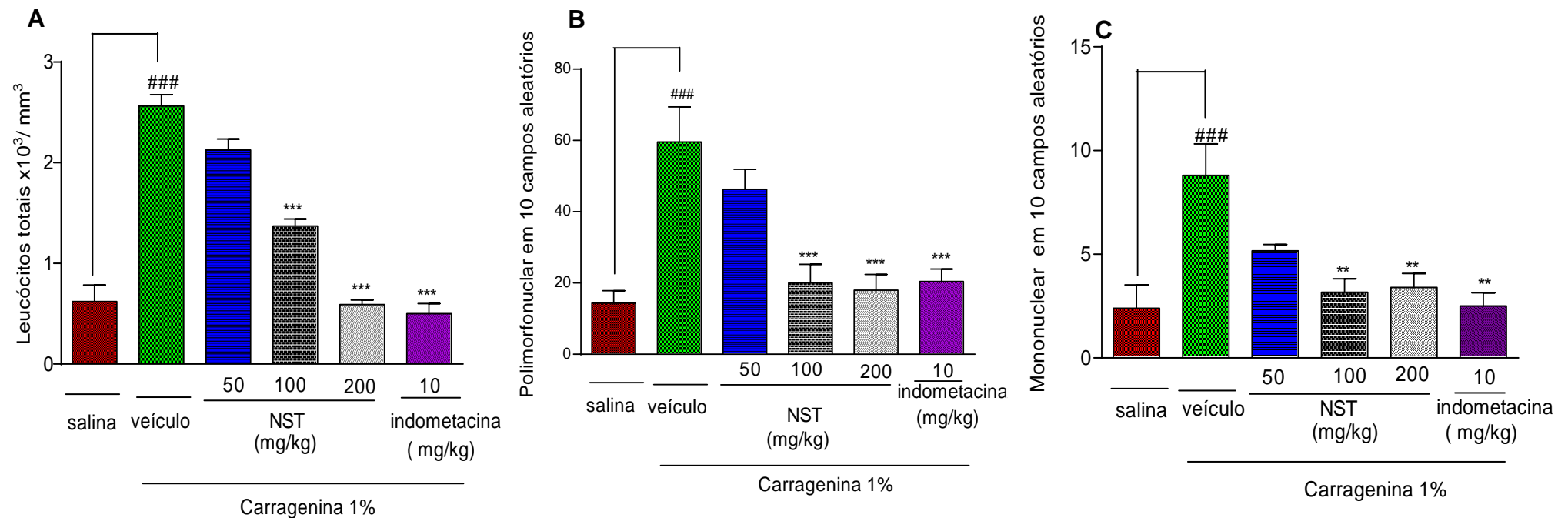
4.10 Efeito do NST sobre o número de leucócitos (contagem total e diferencial) no exsudato de peritonite induzida por carragenina em camundongos

A injeção intraperitoneal de carragenina 1% (500 µg/ 0,05mL) nos camundongos induziu um aumento significativo no número total de leucócitos para a cavidade peritoneal quando comparado ao grupo veículo. O pré-tratamento dos animais com NST (100, 200 mg/kg, i.p.) reduziram de forma significativa ($***p < 0,001$) ($1,37 \pm 0,07$; $0,59 \pm 0,05$) a migração de leucócitos quando comparado ao grupo veículo ($2,56 \pm 0,11$). De forma semelhante, a indometacina (10 mg/kg, i.p.) também reduziu ($***p < 0,001$) ($0,5 \pm 0,1$) a migração de leucócitos para o fluido peritoneal quando comparado ao grupo controle veículo ($2,56 \pm 0,11$) (**Figura 19 A**).

Da mesma forma, o NST (100, 200 mg/kg, i.p.) e a indometacina (10 mg/kg, i.p.) diminuíram de modo significativo ($***p < 0,001$) ($20,0 \pm 5,2$, $18,0 \pm 4,4$ e $20 \pm 3,5$) respectivamente, a migração de leucócitos polimorfonucleares na cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle veículo ($59,6 \pm 9,8$) (**Figura 19 B**).

A migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal também foi diminuída ($**p < 0.01$) ($3,17 \pm 0,65$ e $3,40 \pm 0,68$) nos animais tratados com NST (100 e 200 mg/kg i.p.) quando comparado ao grupo veículo ($8,8 \pm 1,53$). Fato semelhante pode ser descrito para os animais tratados com indometacina (10 mg/kg i.p.) ($**p < 0.01$) ($2,5 \pm 0,65$) (**Figura 19 C**). No entanto, a dose de 50 mg/kg ($p > 0,05$) não apresentou diminuição na migração de leucócitos totais tendo como referência o veículo, também não suprimiu a migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares quando comparado ao veículo.

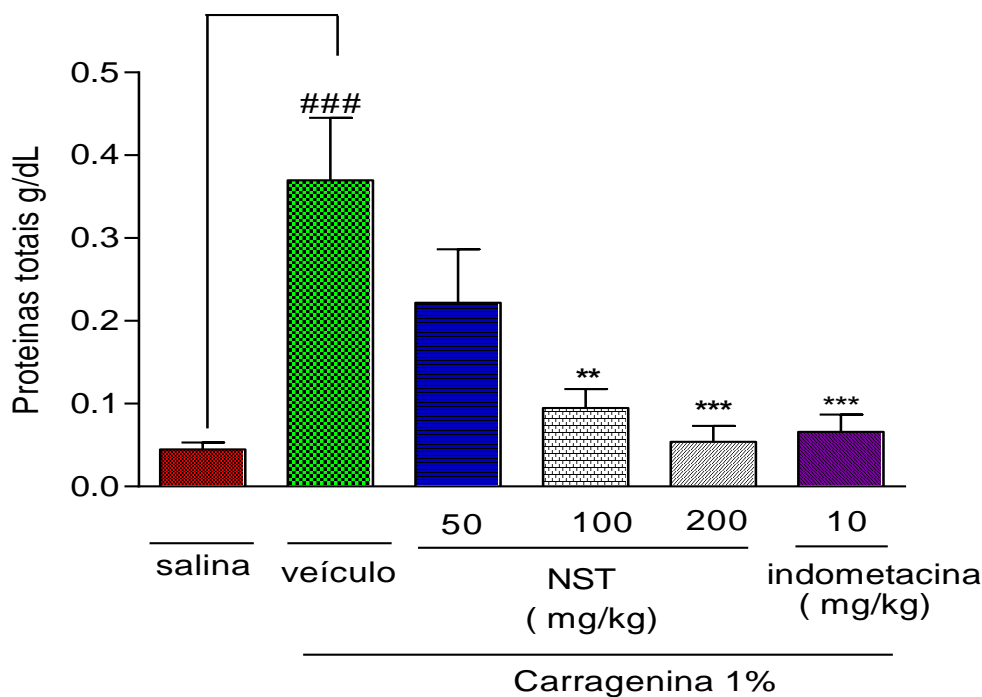
Figura 19: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) no número total (A) e diferencial (Polimorfo e mononuclear B e C) de leucócitos em peritonite induzida por carragenina (500µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. ### $p < 0,001$ veículo vs salina e *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e Teste deTukey).



4.11 Dosagem de proteínas totais no exsudato peritoneal de camundongos

A administração intraperitoneal de carragenina 1% (500 µg /cavidade) induziu no grupo veículo um aumento significativo do número de proteínas totais no exsudato peritoneal. O NST nas doses de 100 e 200 mg/kg, i.p. reduziu de forma significativa (** $p < 0,01$) a concentração de proteínas totais no exsudato peritoneal, tendo como referência o grupo veículo. A indometacina (10 mg/kg, i.p.) também inibiu de forma significativa (** $p < 0,001$) a concentração de proteínas totais comparado ao veículo (**Figura 20**).

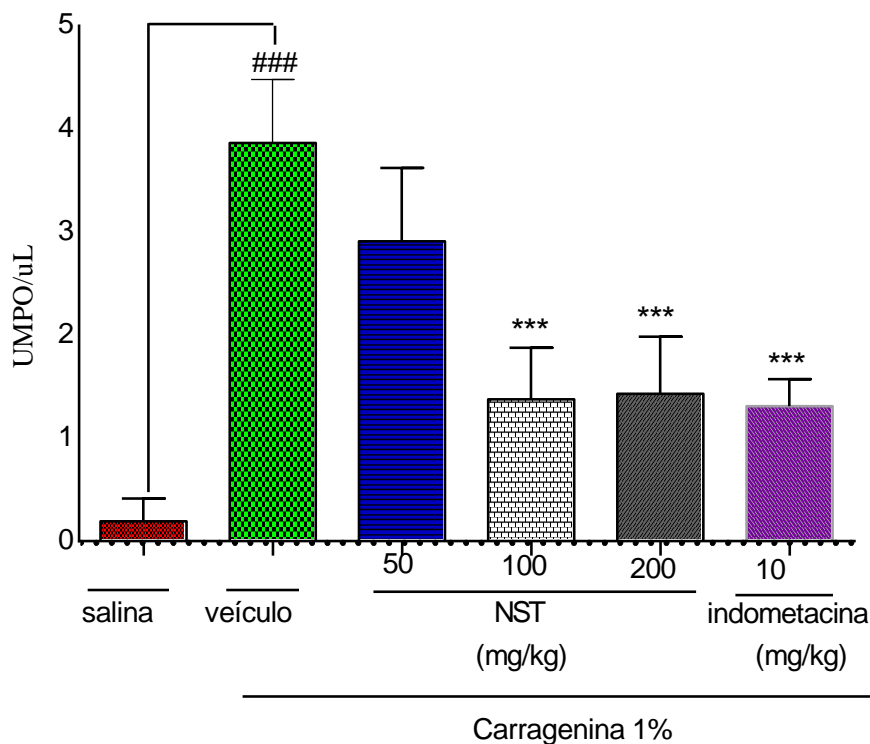
Figura 20: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a concentração de proteínas no exsudato de peritonite induzida por carragenina (500 µg/cavidade, i.p.) em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ### $p < 0,001$ veículo vs salina e ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e Teste deTukey).



4.12 Efeito do NST sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos

A atividade da mieloperoxidase apresentou-se diminuída nos animais tratados previamente com NST nas doses de 100 mg/kg (1.38 ± 0.20 , $***p < 0,001$) e 200 mg/kg ($1,43 \pm 0,24$, $***p < 0,001$) em relação ao grupo veículo ($3,90 \pm 0,31$). O mesmo foi observado nos animais tratados com o anti-inflamatório padrão, indometacina ($1.09 \pm 0,20$ $***p < 0,001$). A dose de 50 mg/kg não apresentou redução significativa da concentração de MPO ($p > 0,05$) comparado ao grupo veículo (**Figura 21**).

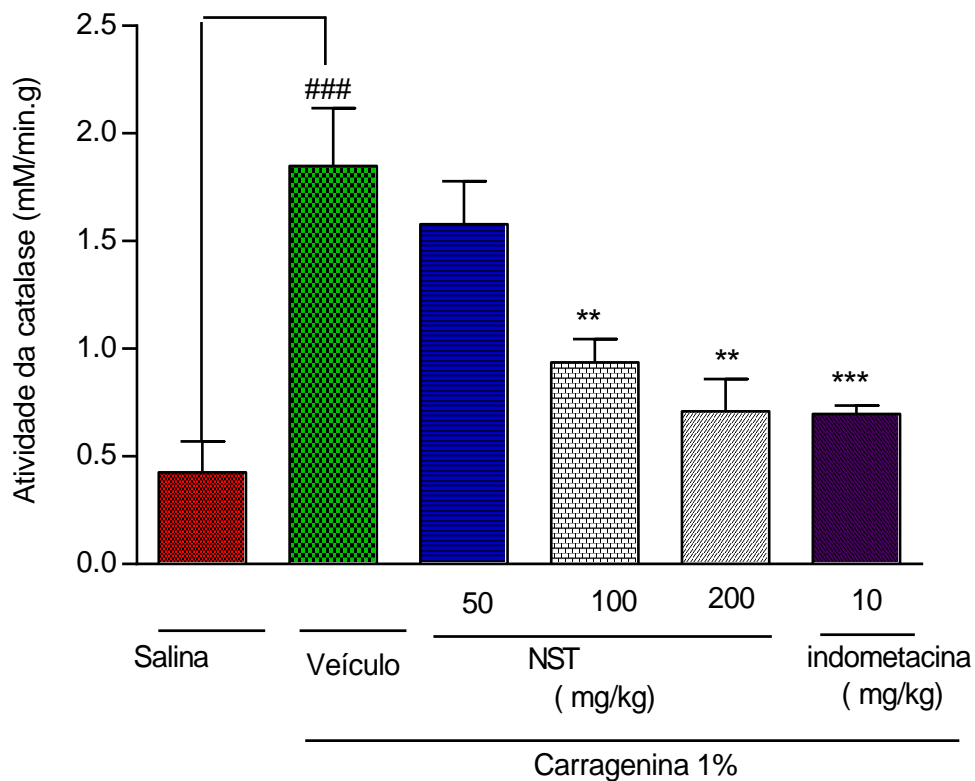
Figura 21: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) na atividade da mieloperoxidase em exsudato de peritonite induzido por carragenina. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



4.13 Efeito do NST sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos

A atividade da catalase apresentou-se significativamente diminuída nos grupos tratados com NST nas doses de 100 mg/kg ($0,93 \pm 0,10$, $**p < 0,01$) e 200 mg/kg ($0,71 \pm 0,15$, $**p < 0,01$) quando comparada ao grupo veículo ($1,84 \pm 0,27$). O grupo tratado com indometacina diminuiu a atividade da catalase de forma significativa ($0,69 \pm 0,04$, $*p < 0,05$) quando comparado ao grupo veículo ($1,84 \pm 0,27$). O tratamento dos animais com NST na dose de 50 mg/kg não diminuiu significativamente a atividade da catalase ($1,57 \pm 0,20$) (**Figura 22**)

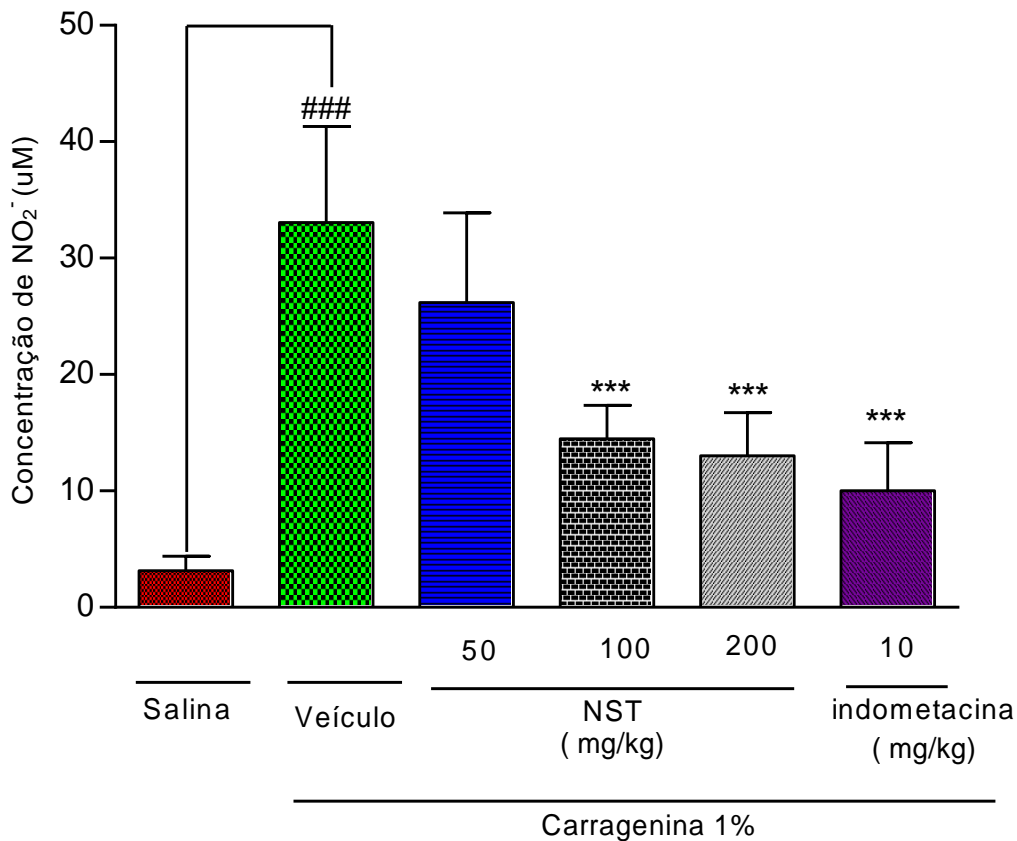
Figura 22: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade da catalase em exsudato de peritonite induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



4.14 Efeito do NST sobre a concentração de nitrito (NO_2^-) em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos

O pré-tratamento dos animais com NST nas doses de 100 e 200 mg/kg reduziu a concentração de nitrito de forma significativa ($14,09 \pm 1,17$, $***p < 0,001$), ($13,02 \pm 1,51$, $***p < 0,001$) quando comparado ao grupo veículo ($33,05 \pm 3,57$). Da mesma forma, os animais tratados com indometacina 10 mg/kg também apresentaram redução significativa da concentração de NO_2^- (nitrito) ($10,02 \pm 1,68$, $***p < 0,001$) quando comparado ao grupo veículo ($33,05 \pm 3,57$). No entanto, a dose de 50 mg/kg ($26,17 \pm 3,16$, $p > 0,05$) não apresentou redução significativa da concentração de nitrito quando comparado ao grupo veículo (**Figura 23**).

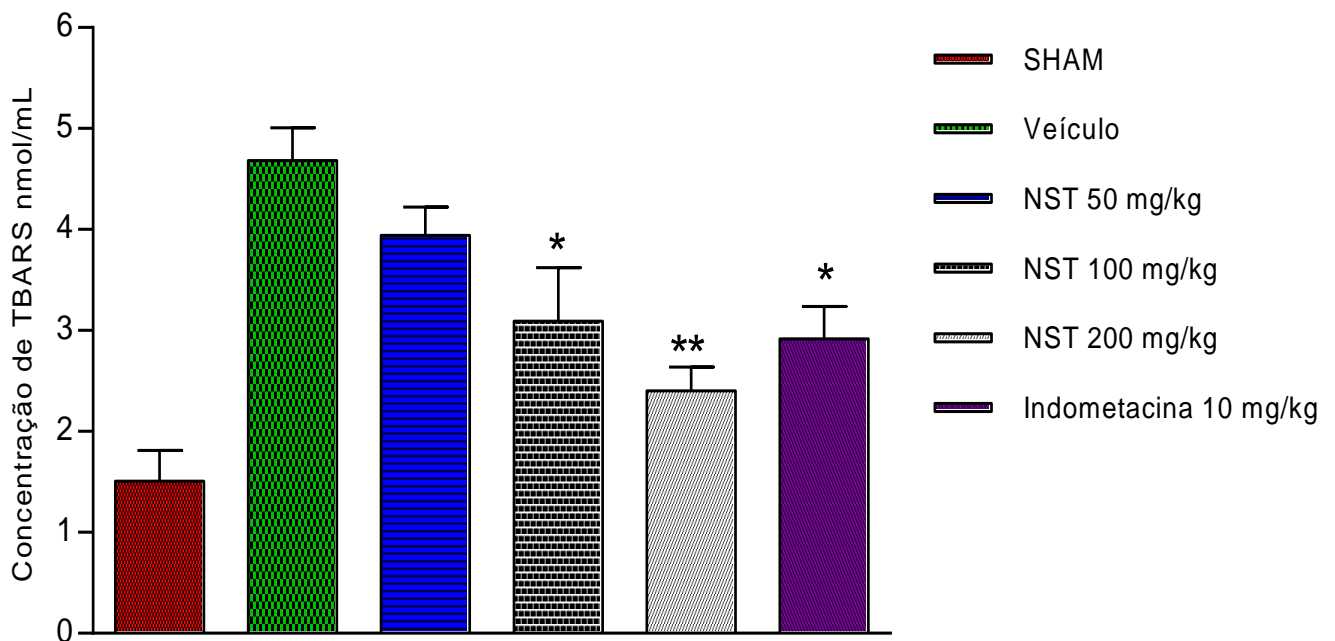
Figura 23: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a concentração de nitrito NO_2^- em exsudato de peritonite induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



4.15 Atividade do NST sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em modelo de peritonite aguda induzida por carragenina em camundongos

O NST nas doses de 100 e 200 mg/kg foi efetivo na redução das concentrações das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, ($3,10 \pm 0,53$ * $p < 0,05$) ($2,40 \pm 0,24$ ** $p < 0,01$) respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($4,68 \pm 0,32$). Da mesma forma, a indometacina diminuiu ($2,94 \pm 0,32$, * $p < 0,05$) a concentração de TBARS quando comparado ao grupo veículo ($4,68 \pm 0,32$,) por outro lado, o NST na dose de 50 mg/kg ($3,94 \pm 0,28$) não obteve os mesmos resultados ($p > 0,05$) (Figura 24).

Figura 24: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.), sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em exsudato de peritonite induzido por carragenina. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



4.16 Efeito do NST sobre a incapacitação articular induzida por carragenina

A injeção de carragenina (50 μ L) na articulação tíbio-femural dos animais provocou incapacitação articular evidenciada pelo aumento no tempo de elevação das patas nos animais tratados apenas com veículo. O grupo pré-tratado com NST na dose de 100 mg/kg (i.p.) mostrou diminuição significativa no TEP durante as quatro horas de observação ($***p<0,001$). Já na quinta e na vigésima quarta hora a significância foi $**p<0,01$ e $*p<0,05$ nesta ordem, comparados ao grupo veículo. Os animais tratados com NST (200 mg/kg i.p.) também apresentaram diminuição do TEP em todos os tempos observados ($***p<0,001$). Na quarta e na vigésima quarta hora a significância foi ($**p<0,01$), tendo como referencia o grupo veículo. A indometacina (10 mg/kg) diminuiu de forma significativa o TEP nas primeiras cinco horas ($***p<0,001$) e na vigésima quarta hora a significância foi ($**p<0,01$) comparada ao grupo veículo. A dose de 50 mg/kg do NST não mostrou inibição significativa no tempo observado ($p> 0,05$) (**Figura 25**) (**Tabela 9**).

Figura 25: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.), indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a incapacitação articular induzida por carragenina (100 µL) em ratas. Os valores estão expressos como média ± E.P.M; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs controle veículo) (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni)

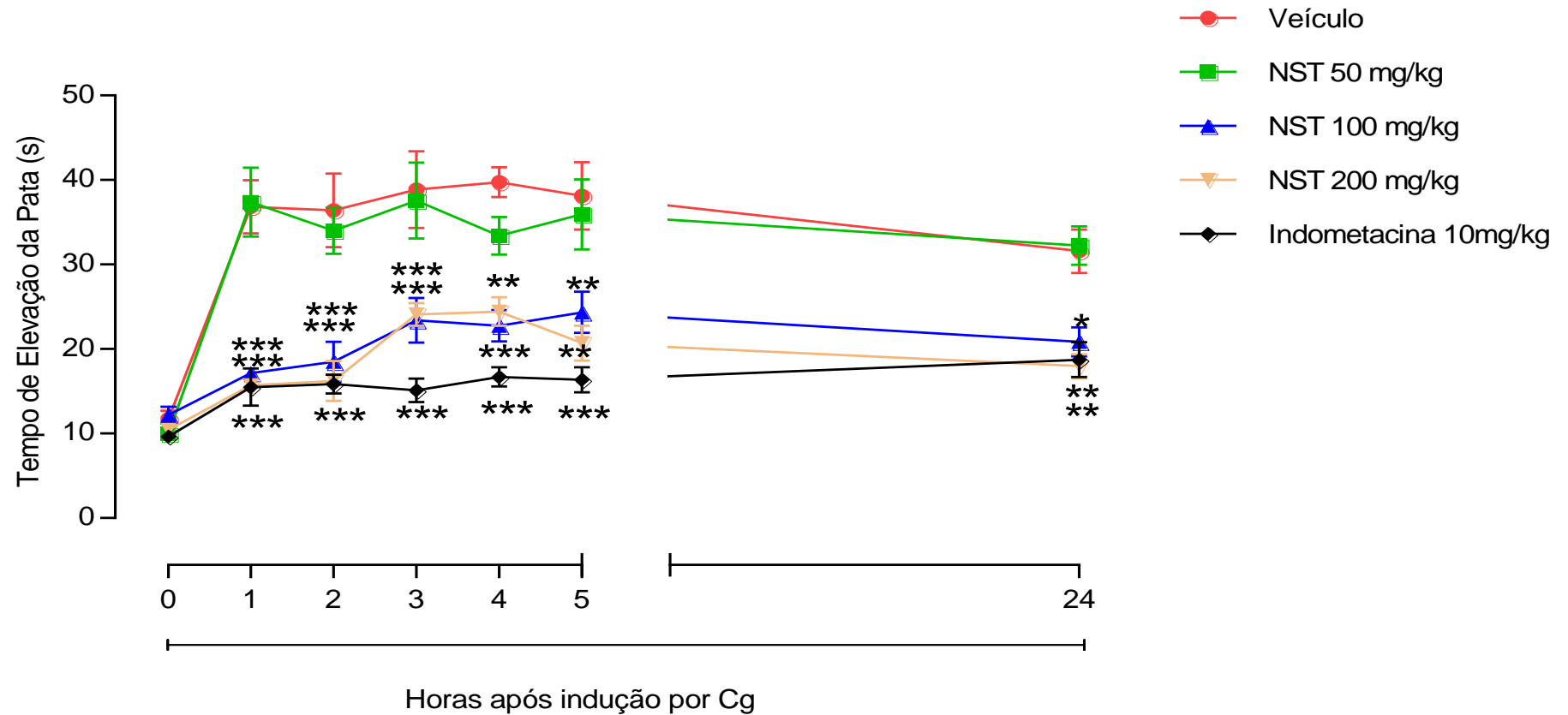


Tabela 9: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.), indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni)

Incapacitação articular						
Tratamento (mg/kg, i.p)	Médias do tempo de elevação da pata (s)					
	1h	2h	3h	4h	5h	24h
Veículo	37,82 \pm 3,14	38,42 \pm 4,36	42,08 \pm 3,96	40,74 \pm 1,76	39,13 \pm 3,96	32,58 \pm 2,56
NST (50)	36,37 \pm 4,09	33,99 \pm 2,73	37,56 \pm 4,49	33,40 \pm 2,22	35,93 \pm 4,16	31,35 \pm 2,27
NST (100)	17,34 \pm 0,22***	21,49 \pm 2,38***	25,39 \pm 2,63***	23,75 \pm 1,85***	26,34 \pm 2,42**	25,86 \pm 1,72*
NST (200)	16,70 \pm 0,77***	16,24 \pm 2,37***	24,10 \pm 1,32***	25,4 \pm 1,69***	23,69 \pm 2,06**	19,98 \pm 0,72**
Indometacina (10)	15,50 \pm 2,19***	15,87 \pm 1,10***	15,12 \pm 1,39***	16,71 \pm 1,14***	16,36 \pm 1,48***	18,75 \pm 2,05**

4.17 Efeito do NST sobre o edema, a dor periférica e o número de leucócitos (contagem total e diferencial) em modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico em ratos

O pré-tratamento dos animais com NST nas doses de 100 e 200 mg/kg inibiu significativamente ($***p<0,001$) o edema de pata induzido por cristais de urato monossódico, administrado na região tibiotársica durante todo o tempo de observação comparado ao grupo veículo (**Figura 26 e 29, Tabela 10**). A indometacina (10 mg/kg) inibiu de forma significativa ($***p<0,001$) a formação do edema já a partir da primeira hora e perdurou por todo tempo de observação, comparativamente ao grupo veículo. O NST na dose de (50 mg/kg) não apresentou inibição significativa do edema de pata induzido por cristais de urato monossódico ($p>0,05$).

A administração de cristais de urato monossódico (100 μ L) na articulação tibiotársica dos animais provocou incapacitação articular evidenciada pelo aumento no tempo de elevação das patas nos animais tratados apenas com veículo. O grupo pré-tratado com NST na dose de (100 mg/kg i.p.) mostrou diminuição significativa do TEP durante todo o tempo de observação, sendo ($***p<0,001$) para as primeiras 48 horas e ($**p<0,01$) ao final das 72 horas de análise com referência ao grupo veículo. Os animais tratados com NST (200 mg/kg i.p.) também apresentaram diminuição do TEP em todos os tempos observados com significância para as primeiras quatro horas de ($*p<0,05$), na vigésima quarta hora e ao final das setenta e duas horas a significância foi de ($**p<0,01$), no entanto, para o intervalo de tempo de quarenta e oito horas a significância foi de ($***p<0,001$), comparada ao grupo veículo. A indometacina (10 mg/kg) diminuiu de forma significativa ($***p<0,001$) o TEP durante todo o tempo de observação, comparado ao grupo veículo. A dose de 50 mg/kg do NST não mostrou inibição significativa no tempo observado ($p> 0,05$) (**Figura 27**) (**Tabela 11**)

O pré-tratamento dos animais com NST (100, 200 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa $911,4\pm79$ e 903 ± 46 ($***p<0,001$) a migração de leucócitos totais quando comparado ao grupo veículo (1643 ± 138). De forma semelhante, a indometacina (10 mg/kg, i.p.) também reduziu ($***p<0,001$) $913,7\pm64$ a migração de leucócitos para o sítio inflamatório quando comparado ao grupo controle veículo (1643 ± 138) (**Figura 28A**).

Da mesma forma, o tratamento com NST (100, 200 mg/kg, i.p.) e a indometacina (10 mg/kg, i.p) diminuiu de modo significativo ($***p < 0,001$) $105,8 \pm 13$, $97,7 \pm 10$ e $99,7 \pm 8$ respectivamente a migração de leucócitos polimorfonucleares para a região tibiotársica quando comparado ao grupo controle veículo ($227,5 \pm 13$ (**Figura 28B**)).

A migração de células mononucleares para a região tibiotársica também foi diminuída ($***p < 0.001$) nos animais tratados com NST (100, 200 mg/kg i.p.) ($105,8 \pm 13$; $97,7 \pm 10$) quando comparado ao grupo veículo ($227,5 \pm 20$). O mesmo pode ser descrito para os animais tratados com indometacina (10 mg/kg i.p.) ($***p < 0.001$) ($99,7 \pm 8$) (**Figura 28C**). No entanto, a dose de 50 mg/kg não apresentou diminuição ($p > 0,05$) na migração de leucócitos totais tendo como referência o veículo, também não suprimiu a migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares quando comparado ao veículo.

Figura 26: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre o edema de pata induzido por cristais de urato monossódico (artrite gotosa) em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

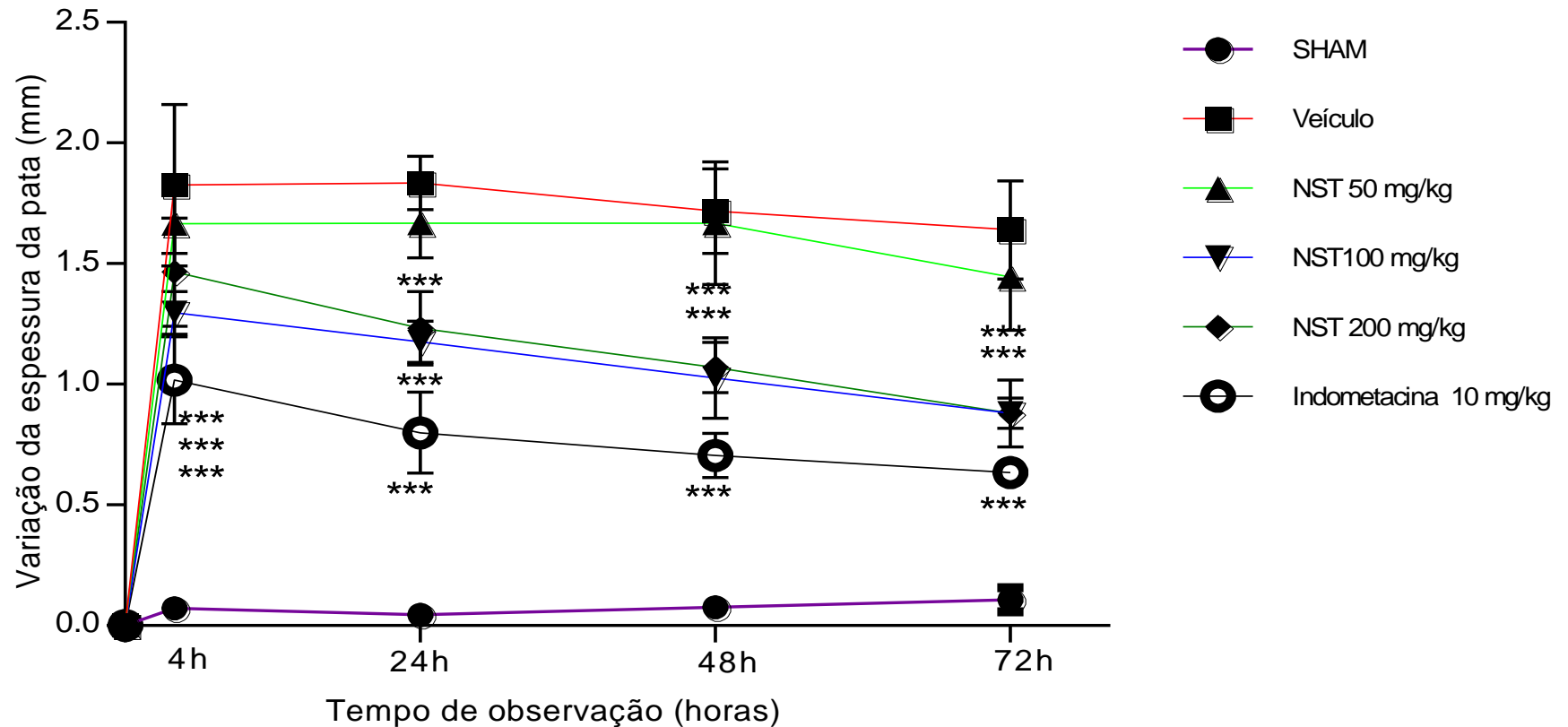


Tabela 10: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre o edema de pata induzido por cristais de ácido úrico monossódico em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Edema de pata (mm)				
Intervalo de tempo				
Tratamento (mg/kg, i.p.)	4h	24h	48h	72h
SHAM	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02
Veículo	1,82 \pm 0,17	1,84 \pm 0,06	1,72 \pm 0,09	1,64 \pm 0,10
NST (50)	1,66 \pm 0,06	1,67 \pm 0,07	1,65 \pm 0,13	1,44 \pm 0,11
NST (100)	1,30 \pm 0,04***	1,18 \pm 0,05***	1,03 \pm 0,07***	0,88 \pm 0,06***
NST (200)	1,47 \pm 0,11***	1,23 \pm 0,08***	1,07 \pm 0,05***	0,88 \pm 0,03***
Indometacina (10)	1,02 \pm 0,09***	0,80 \pm 0,08***	0,71 \pm 0,05***	0,63 \pm 0,02***

Figura 27: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico (artrite gotosa) em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

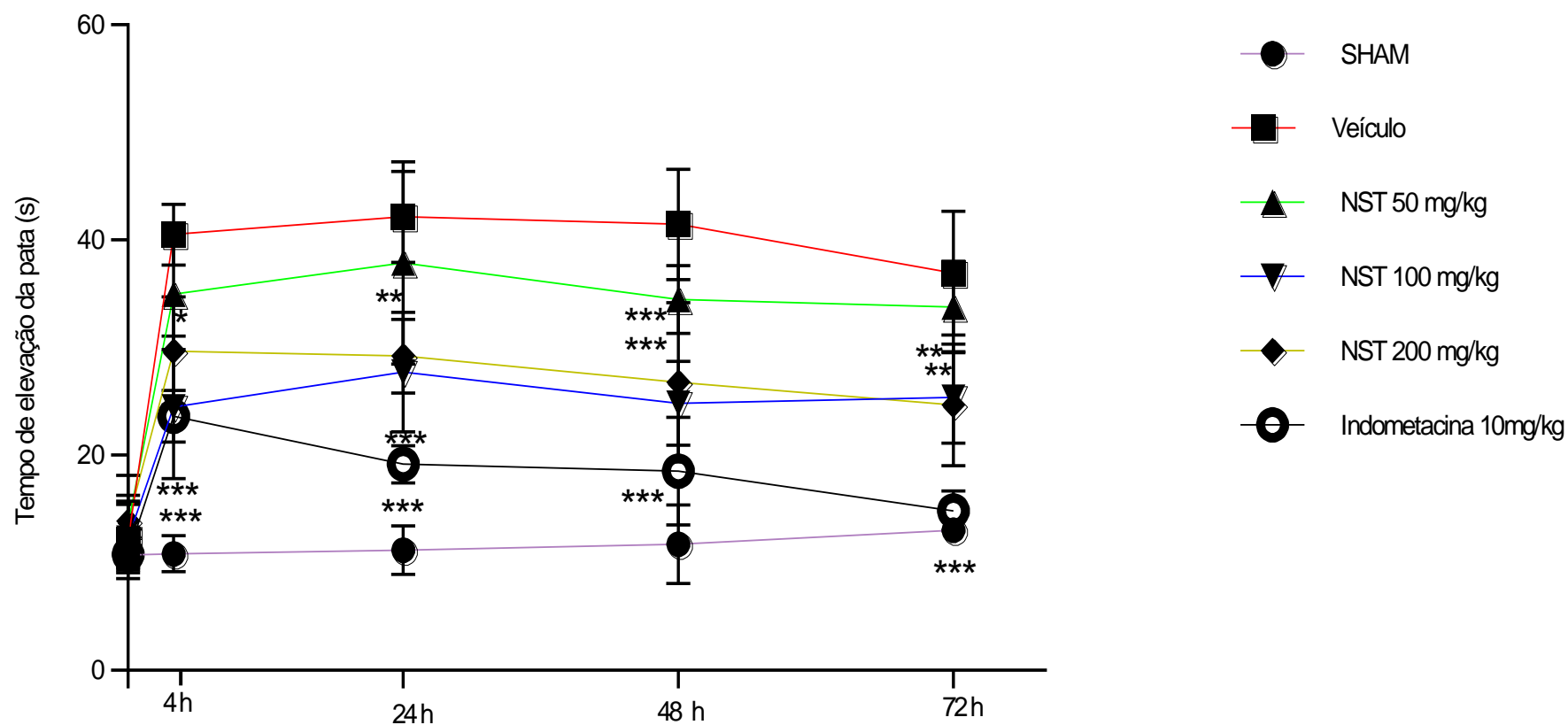


Tabela 11: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Incapacitação articular					
Médias do tempo de elevação da pata (s)					
Tratamento (mg/kg, i.p.)	0h	4h	24h	48h	72h
SHAM	10,73 \pm 0,70	10,84 \pm 0,84	11,17 \pm 1,13	11,73 \pm 1,83	13,02 \pm 0,31
Veículo	12,13 \pm 1,75	40,52 \pm 1,41	42,16 \pm 2,11	41,46 \pm 2,57	36,92 \pm 2,88
NST (50)	13,60 \pm 1,35	34,99 \pm 2,59	37,87 \pm 4,70	34,48 \pm 1,58	33,80 \pm 2,13
NST (100)	12,25 \pm 1,41	24,45 \pm 2,92***	27,72 \pm 2,48***	24,82 \pm 1,75***	25,38 \pm 1,90**
NST (200)	13,88 \pm 2,12	29,69 \pm 2,52*	29,22 \pm 1,71**	26,77 \pm 3,70***	24,66 \pm 2,82**
Indometacina (10)	10,76 \pm 0,61	23,63 \pm 1,20***	19,16 \pm 0,86***	18,53 \pm 2,50***	14,81 \pm 0,92***

Figura 28: Efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) no número total (A) e diferencial (Polimorfo e mononuclear B e C) de leucócitos na incapacitação articular induzida por cristais de urato monossódico em ratos. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ### p <0,001 veículo vs salina e * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 vs veículo (ANOVA one way e Teste deTukey).

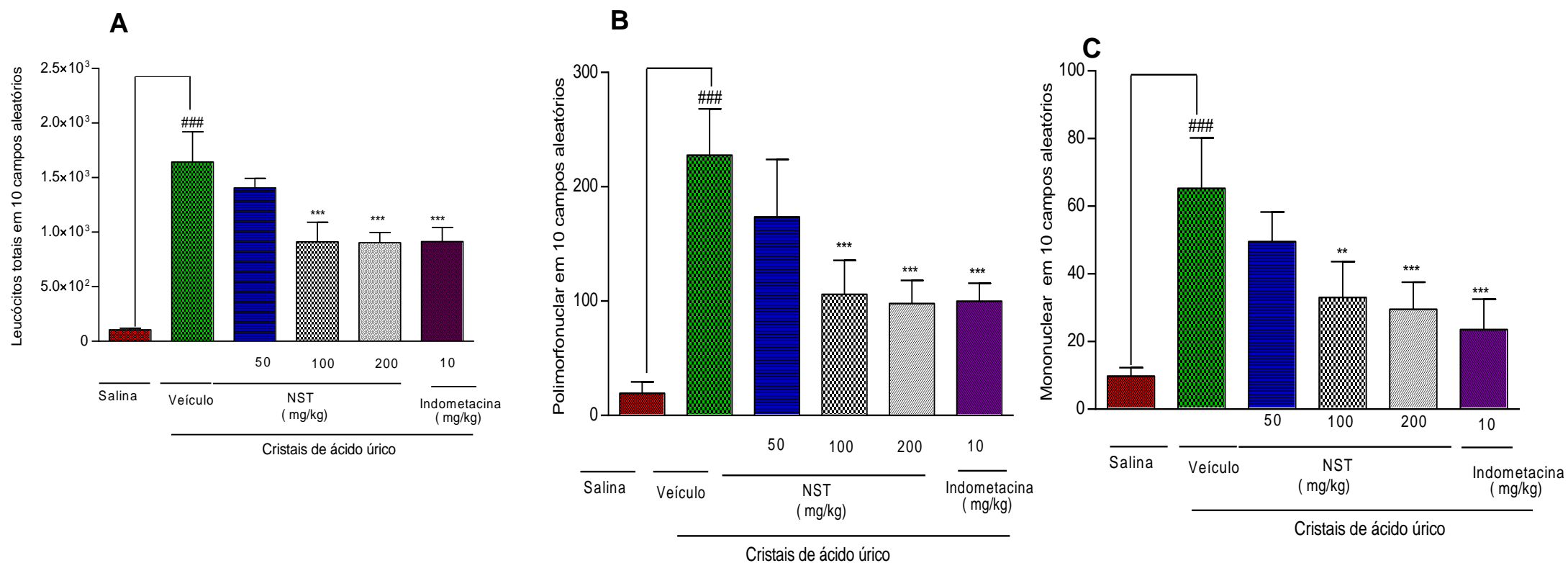
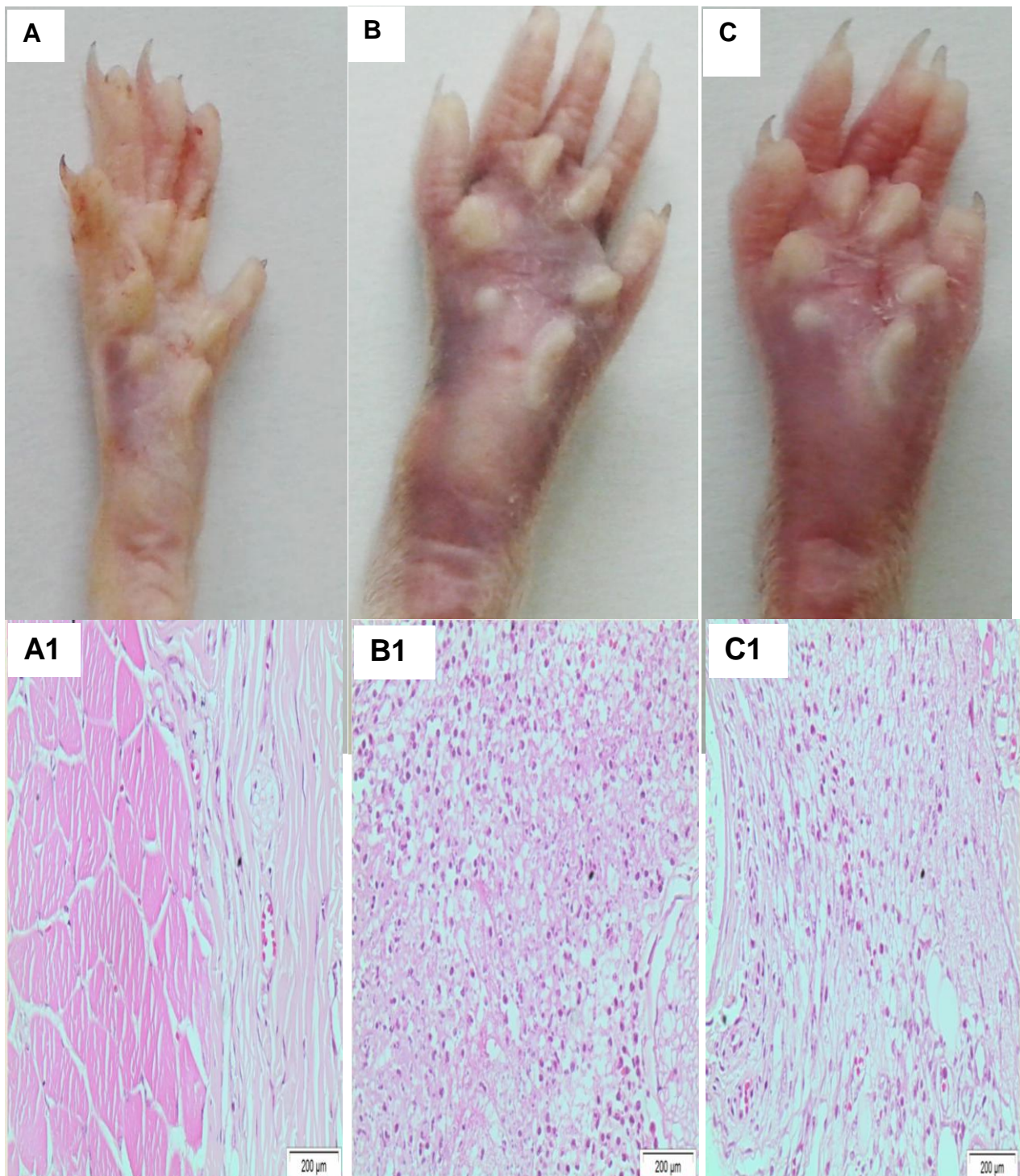
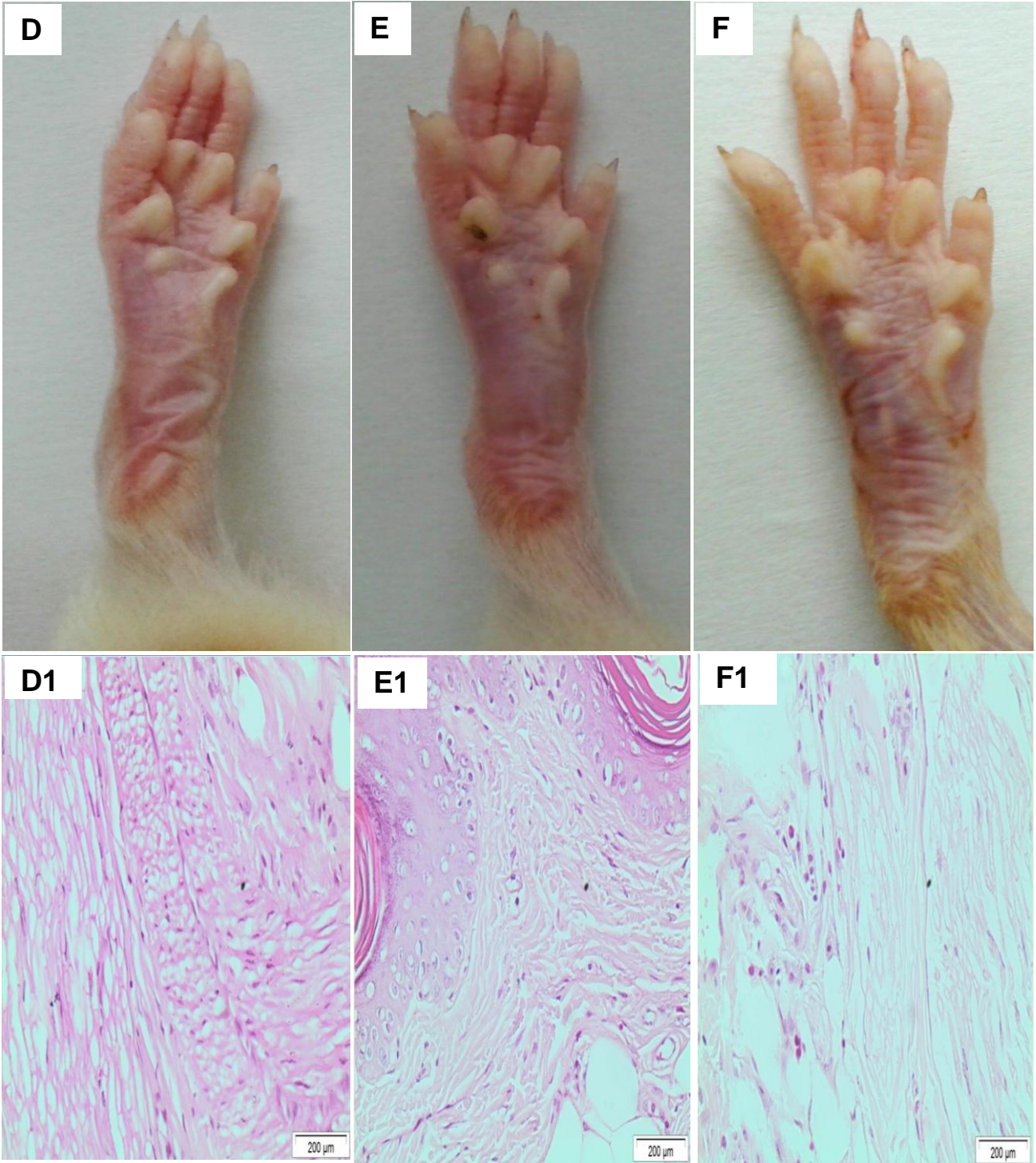


Figura 29: Fotografias do efeito do NST (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80,) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre o edema induzido por cristais de ácido úrico. O tecido foi obtido de fragmento da pata na região tibiotársica de animais submetidos ou não aos cristais de ácido úrico (40mg/mL); (**A, A1**) rato tratado apenas com salina; (**B, B1**) rato tratado com veículo (**C, C1**) ratos tratados com o NST (50 mg/kg, i.p.); (**D, D1**) ratos tratados com o NST (100 mg/kg, i.p.); (**E, E1**) animais tratados com o NST(200 mg/kg, i.p.) e (**F, F1**) animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.).



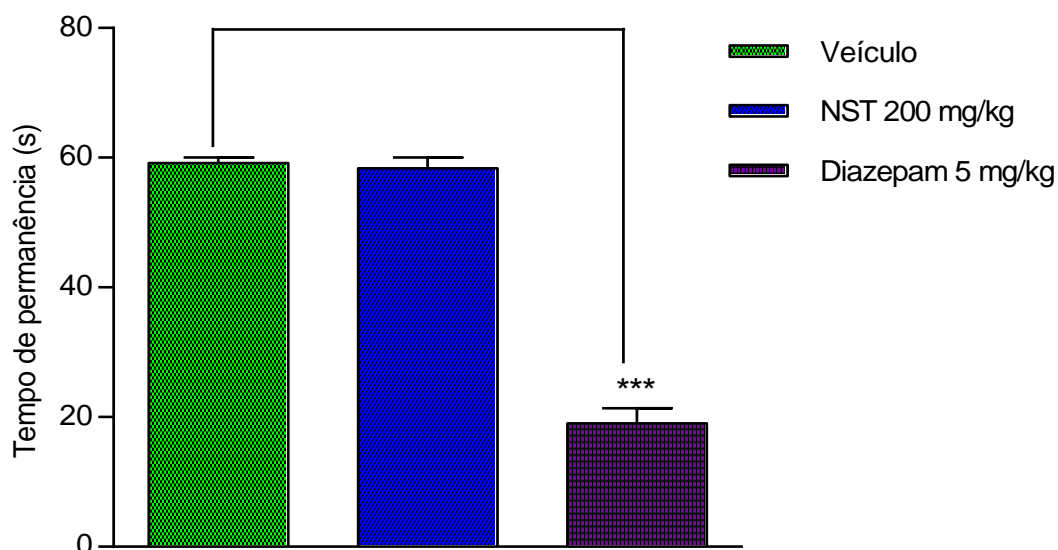


Fonte: Arquivo pessoal

4.18 Efeito do NST sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod

O pré-tratamento dos animais com NST na dose de 200 mg/kg não resultou em diminuição da coordenação motora na dose testada (**Figura 30**). O diazepam (5 mg/kg i.p.), diminuiu o tempo de permanência na barra rotatória com média ($1905 \pm 2,32$) em comparação ao grupo veículo ($59,17 \pm 0,83$).

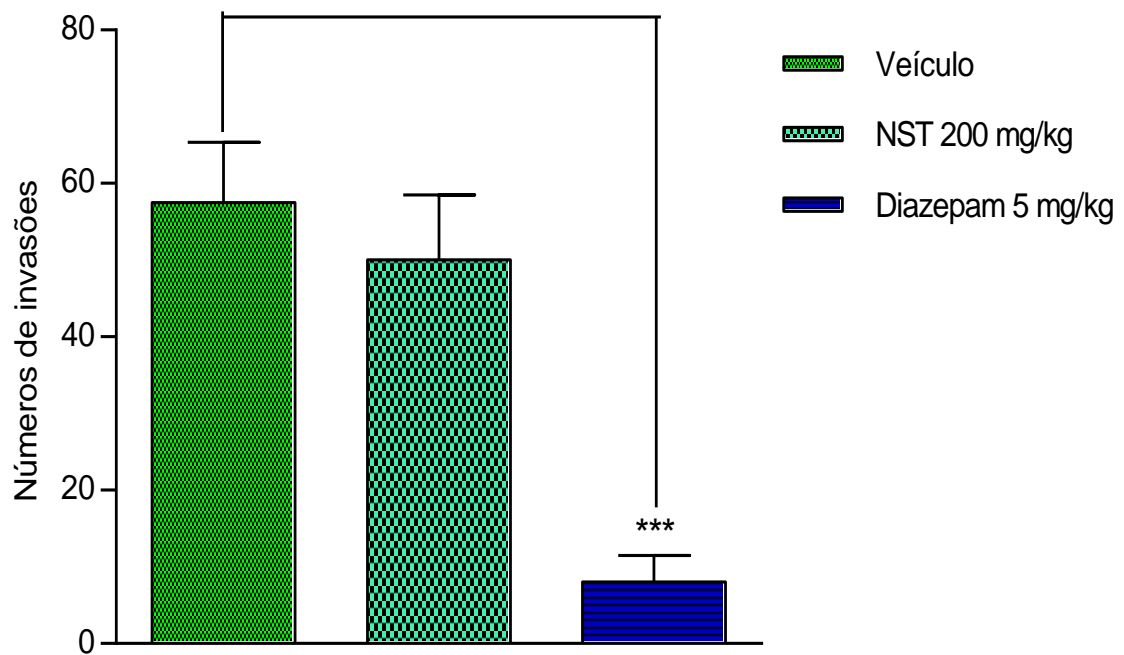
Figura 30: Efeito do NST (200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a coordenação motora em camundongos expressa como tempo de permanência na barra rotatória. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



4.19 Efeito do NST sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto

De forma semelhante ao modelo de permanência na barra giratória, o diazepam 5 mg/kg ($8,00 \pm 3,51$) diminuiu de forma significativa do número de invasões em relação ao grupo veículo ($57,50 \pm 7,87$) (**Figura 31**). O NST na dose de 200 mg/kg não resultou em alteração da capacidade exploratória dos camundongos comparado ao grupo veículo ($50,00 \pm 8,52$, $p > 0,05$).

Figura 31: Efeito do NST (200 mg/kg, i.p.), veículo (NaCl 0,9% + 5% Tween 80) e indometacina (10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade exploratória em camundongos expressa em número de invasões. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



5 DISCUSSÃO

Compostos formados por núcleo indólico estão presentes em bactérias, plantas e animais. Normalmente, estes compostos estão relacionados com o metabolismo do aminoácido triptofano e podem apresentar ligantes em regiões diferentes do anel indólico (CANO et al., 2003). O anel indólico possui uma estrutura heterocíclica, foi descoberta em 1866, e está presente em um número considerável de produtos medicinais derivados principalmente de plantas (WILLIAMS, 2001). O NST é constituído por um núcleo indolico cuja estrutura química está relacionada com a *N*-benzotriptamina (**Figura 4**), um alcalóide indólico isolado da espécie *Myrtopsis myrtoidea* (Baill) Guillaumin, (HIFNAWAY, 1957).

Contudo, não se encontram na literatura estudos correlacionados à propriedade anti-inflamatória do *N*-saliciloilriptamina (NST), em modelos experimentais que mimetizem uma resposta inflamatória, fato que garante o ineditismo do nosso trabalho.

Inicialmente avaliamos os possíveis efeitos tóxicos da substância com a administração oral do NST na dose de até 2000 mg/kg, e esta não apresentou toxicidade aos camundongos durante o tempo de observação de 14 dias. Em seguida, a toxicidade foi avaliada pela via intraperitoneal. Neste protocolo, os animais receberam 2000 mg/kg e ficaram em observação por 14 dias, durante o estudo não foram observadas alterações no sistema respiratório, sistema locomotor, sistema nervoso central, periférico, somático e autônomo. Foi observado também sobrevivência de 100% dos animais tratados com essa dose de 2000 mg/kg, assim não foi possível estabelecer a DL50.

A literatura mostra que vários derivados sintéticos de alcalóides indólicos não apresentam atividade toxicológica expressiva, por exemplo, a vimpocetina um derivado sintético da vincamina, apresentou efeito neuroprotetor em modelos experimentais com animais (PEREIRA et al., 2003). Da mesma forma, derivados indólicos presentes em tecido biológico como triptofano, melatonina e serotonina são potentes sequestradores de radicais hidroxílicos (STOLC, 1999; CANO et al., 2003).

Logo após os estudos de toxicidade foi avaliada a atividade do NST no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, esse é um modelo clássico para triagem de drogas com atividade anti-inflamatória bastante usado desde sua descrição por Winter (1969). Através deste modelo os pesquisadores Merck, Sharp e

Dohme demonstraram a atividade anti-inflamatória da indometacina (WILLOUGHBY, 2003).

A inflamação aguda induzida por carragenina é um processo não imune, e bastante reproduzível. Quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal, a carragenina induz os sinais cardinais da inflamação como edema (tumor), eritema (rubor) calor e hiperalgesia que se desenvolvem imediatamente em decorrência da presença de vários mediadores pró-inflamatórios plasmáticos como a histamina, serotonina, bradicinina, citocinas ou das células envolvidas na resposta inflamatória (MORRIS, 2003; SADEGHI et al., 2011).

Os resultados apresentados neste estudo mostram que o pré-tratamento dos animais com o NST (100 e 200 mg/kg i.p.) reduziu o edema de pata da 1ª à 5ª hora, de maneira semelhante a indometacina, isto sugere que a atividade anti-inflamatória desta substância pode estar relacionada com a inibição de mediadores inflamatórios endógenos como histamina, serotonina e bradicinina e também mediadores tardios como, por exemplo, a inibição da biossíntese da ciclo-oxigenase e conseqüentemente, diminuição da expressão das prostaglandinas.

Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram relatados para outras substâncias constituídas por núcleo indólico, como criptolepina e a evodiamina, as quais inibiram a formação do edema induzido por carragenina através de mecanismos relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas, NO, histamina, serotonina, bradicinina e inibição da expressão do fator nuclear kappa B (NF-κB). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que outros alcalóides indólicos também diminuiriam os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucina-1β, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos (CHOI et al., 2006). Manikandan et al. (2014) avaliaram a atividade farmacológica de várias substâncias que continham o núcleo indólico e comprovaram que as mesmas agiam como agente anti-neuroinflamatório, por inibir a expressão de COX-2.

Dando continuidade aos estudos com o NST fez-se necessário a realização de uma série de experimentos com modelos de inflamação aguda *in vivo*, para isso foi escolhido a menor dose eficaz (100 mg/kg).

Vários modelos experimentais podem ser empregados para investigar o potencial anti-inflamatório de uma substância com potencialidade terapêutica, entre os mais comuns podemos citar o edema de pata induzido por agentes flogísticos,

como a carragenina já citado anteriormente, e a dextrana, estes agentes indutores de inflamação induzem uma série de eventos vasculares dentre eles promovem o extravasamento vascular, a migração de células para o sitio inflamatório e a liberação de mediadores endógenos (WINTER et al., 1962).

Assim, o passo seguinte foi avaliar a atividade farmacológica do NST no modelo de edema de pata induzido por dextrana (LEMBECK, 1980). A dextrana é caracterizada como homopolissacarídeo ramificado de alto peso molecular biossintetizado por *Leuconostoc mesenteroides*, formada por unidades de D-glicose conectada por ligações $\alpha(1-6)$ (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). O edema induzido por esse agente promove desgranulação de mastócitos, e a liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (METCALFE, 2008).

O estudo mostrou que o tratamento prévio dos camundongos com NST reduziu significativamente o edema de pata induzido por dextrana durante todo o tempo de observação. Esse padrão de resposta no grupo que recebeu NST também foi obtido no grupo tratado com a indometacina.

As substâncias antiedematogênicas que inibem o edema de pata induzido por dextrana, possivelmente atuam por mecanismos distintos. Um possível mecanismo seria agir diretamente sobre a inibição da permeabilidade tissular ou da dinâmica de fluidos; a segunda possibilidade seria o NST antagonizar especificamente os agentes responsáveis diretamente pelo edema, dessa forma, interromper os processos fisiológicos que levam à formação dos agentes edematogênicos (COURVOISIER; DUCROT, 1955). No presente trabalho, o NST promoveu uma diminuição da formação do edema induzido pela injeção intraplantar de dextrana, sugerindo sua capacidade de bloquear as ações da histamina e serotonina. Este resultado sugere que o NST deve apresentar ação direta na estabilização da membrana dos mastócitos impedindo assim a sua degranulação, ou ainda algumas propriedades antagonistas específicas. Vários alcalóides indólicos extraídos de fontes marinhas apresentaram atividade anti-inflamatória por inibir o edema de pata induzido por dextrana e carragenina (JASWIR; MONSUR, 2011). Com base nos resultados obtidos com o NST nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina e dextrana, e devido ao importante papel de mediadores endógenos liberados por estes agentes flogísticos, nos propomos a investigar a atividade antiedematogênica do NST no modelo de edema de pata induzido pelo composto 48/80.

O composto 48/80 é uma poliamina básica, que induz a desgranulação de mastócitos através da ligação a um sítio na membrana celular, um evento que parece estar associado a um influxo de Ca^{2+} na célula (NORRBY, 1981). O modelo de edema de pata pelo composto 48/80 é bastante utilizado para avaliar drogas com possível atividade antiedematogênica. Esse composto induz a desgranulação de mastócitos favorecendo a liberação de histamina e serotonina no local da inflamação, estes mediadores resultantes da desgranulação dos mastócitos são responsáveis pela formação do edema (YANG et al., 2002).

Os resultados mostram que o tratamento dos animais com NST reduziu significativamente o edema induzido pelo composto 48/80. Isto sugere que o efeito antiedematogênico do NST deve-se em parte, à estabilização dos mastócitos, prevenindo a sua degranulação e impedindo a liberação de mediadores endógenos como histamina e serotonina, corroborando com o modelo anterior onde os animais receberam dextrana como agente edematogênico.

De acordo com os resultados obtidos com o NST no edema de pata induzido pelo composto 48/80 e sabendo-se da importância da histamina no processo inflamatório agudo, passou-se a investigar a atividade antiedematogênica do NST no modelo de edema de pata induzido por histamina.

A histamina é vastamente distribuída nos tecidos, pode ser sintetizada e liberada por diferentes células, dentre estas células destacam-se os mastócitos, basófilos e plaquetas. Pode ser liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas com participação do sistema complemento (C3a e C5a), Imunoglobulina E (IgE), e citocinas (IL-1 e IL-8) (HEBERT; JUST; SCHIMIDT, 2001), induzindo ação edematogênica em pouco tempo (BRAND et al., 2002).

O edema de pata induzido por histamina é um modelo clássico vastamente utilizado para provar os efeitos antiedematogênico de algumas plantas medicinais (TAMADDONFARD et al., 2012). A atividade farmacológica de uma substância sobre a histamina pode ser observada basicamente sobre duas vias, primeiro sobre o processo de degranulação dos mastócitos, induzida por substância como o composto 48/80 ou ainda pela administração de histamina no próprio tecido (GUO et al., 1997).

A histamina pode se ligar basicamente a quatro subtipos de receptor acoplados à proteína G (HR1, HR2, HR3 e HR4), que podem favorecer a formação de fosfatidil inositol (IP3), e conseqüentemente, aumentar os níveis de cálcio

intracelular, e promover a ativação de fatores de transcrição nuclear como, por exemplo, o NF- κ B e da via da adenilato ciclase. Os subtipos de receptores HR1 e HR2 estão envolvidos na maioria das respostas inflamatórias induzidas pela histamina (JUTEL et al., 2009). A histamina é responsável por uma série de modificações vasculares dentre elas promove a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, favorece a síntese do fator de ativação plaquetária (PAF), síntese de prostaciclina (PGI₂), e por ultimo induz a liberação de NO (BORK, 2014).

De acordo com os resultados obtidos, o NST demonstrou efeito antiedematogênico ao inibir o edema de pata induzido pela histamina, dessa forma é possível sugerir que esta substância possa interferir na ligação da histamina em seus receptores, ou ainda como dissera anteriormente, inibe a exocitose de histamina no meio intersticial. Este fato corrobora com os resultados anteriores, onde foram utilizados diferentes agentes edematogênicos que culminavam com a liberação de histamina no meio intersticial e mesmo assim, o edema apresentou-se menor em relação ao grupo controle veículo.

Corroborando ainda com os resultados encontrados, Barbosa-Filho e colaboradores (2006) demonstraram que outras substâncias com estrutura química similar ao NST, contendo núcleo indólico também apresentaram atividade antiedematogênica no modelo de edema de pata induzido por histamina.

Considerando a atividade antiedematogênica do NST sobre o edema de pata induzido por histamina, e que a serotonina é o segundo mediador vasoativo pré-formado, e possui ações semelhantes à histamina (GOADSBY; LIPTON; FERRARI, 2002), resolvemos averiguar a atividade farmacológica do NST no edema de pata induzido por este agente flogístico.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é produzida por células enterocromafins, encontrada no epitélio do trato gastrointestinal (SCHWORER, 2000). Também pode ser liberada por células mastocitárias e plaquetas. As plaquetas concentram este neurotransmissor por meio de um mecanismo de transporte ativo (SEPIASHVILI et al., 2013).

A 5-HT possui atividades fisiológicas semelhantes às da histamina, induz a vasodilatação, favorece a permeabilidade vascular, e é considerada como importante neurotransmissor, pois participa diretamente na sensibilização de nociceptores. Na resposta inflamatória, a serotonina pode influenciar na migração e proliferação de linfócitos, favorecer a fagocitose e a atividade citolítica celular,

participa também, da síntese de citocinas e quimiocinas. A grande diversidade dos efeitos imunomoduladores da serotonina é basicamente devido à heterogeneidade dos receptores serotoninérgicos (SEPIASHVILI et al., 2013).

Os resultados mostram que o NST foi efetivo em diminuir o edema de pata induzido por serotonina quando comparado a grupo veículo. Sabe-se que a serotonina modula a resposta inflamatória, por favorecer a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, a mobilidade a proliferação de linfócitos, a fagocitose, e as propriedades citolíticas, favorecendo a síntese de citocinas e quimiocinas (JUTEL et al., 2009), como dissera anteriormente. Sendo assim, é conveniente sugerir que o NST possa atuar modulando negativamente a expressão da serotonina no sítio inflamatório, isso pode ser demonstrado em parte nos modelos experimentais aqui desenvolvidos e mostrados adiante onde ficou comprovado que o NST diminuiu o extravazamento proteico, bem como a diminuição de células mononucleares, em especial dos linfócitos no exsudato peritoneal.

Corroborando com os nossos resultados, alguns trabalhos mostram que alcaloides contendo núcleo indólico apresentaram atividade antiedematogênica no modelo de edema de pata induzido por serotonina (SUZUKI et al., 1983; MATSUDA et al., 1998).

Diante do efeito positivo do NST nos diferentes edemas testados até aqui, resolvemos constatar a atividade antiedematogênica do NST agora no edema de pata induzido por capsaicina.

Os agentes flogísticos vistos até agora são responsáveis pela ativação química do processo inflamatório. Essas substâncias podem ativar diversas vias da cascata inflamatória, induzindo os sinais clássicos da inflamação já citados anteriormente. Por ativar diferentes vias, o uso de vários agentes flogísticos pode ser justificado pela especificidade do seu mecanismo muito bem descrito na literatura, ainda assim o uso da capsaicina bem como os outros agentes flogísticos podem sugerir prováveis mecanismos de ação anti-inflamatória da substância em estudo (GÁBOR, 2000).

De maneira semelhante aos outros agentes edematogênicos a injeção intraplantar de capsaicina na pata traseira de camundongos foi capaz de induzir aumento no volume da pata. O edema induzido por capsaicina é um modelo clássico utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de diversas substâncias (SOUZA et al., 2009). A capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonenamida) é um componente

pungente da pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, é uma ferramenta farmacológica utilizada para induzir respostas inflamatórias agudas neurogênicas tais como vasodilatação, extravasamento de plasma, e sensibilização dolorosa (TANG, HAAS., 2004).

A capsaicina é uma ferramenta farmacológica utilizada para induzir a inflamação neurogênica através da ativação de receptores vanilóides específicos, denominados receptores vanilóides de potencial transiente do tipo 1 (TRPV1), que seguidamente abre canais iônicos gerando influxo de cálcio na fibra nervosa, levando à despolarização das fibras C e A δ e conseqüentemente, induz a sensação de ardência, hiperalgesia e formação do edema (CATERINA et al., 1997; FIORENTINO; CAIRNS, 2000). O aumento de cálcio induz a liberação de outros neurotransmissores e neuromoduladores nas fibras sensoriais, como substância P e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina, responsáveis pela inflamação neurogênica, bem como pela vasodilatação, migração celular e extravasamento plasmático (HOLZER, 1988).

No modelo de edema de pata induzido por capsaicina o NST foi capaz de inibir o edema logo nos primeiros 30 minutos e esse efeito perdurou durante todo o tempo de observação. Da mesma forma, a indometacina também reduziu o edema durante o tempo observado de 120 minutos.

Os resultados desta investigação sugerem duas possíveis interpretações para o efeito antiedematogênico do NST no edema de pata induzido por capsaicina. Em primeiro lugar, o NST estaria impedindo a liberação direta de mediadores inflamatórios dos terminais neuronais. Em segundo lugar, o NST poderia inibir a atividade inflamatória inerente à molécula da capsaicina, pois sabe-se que a mesma pode atuar de uma forma não neurogênica quando aplicada em determinado tecido vivo (ANAND; BLEY, 2011).

Corroborando com nosso trabalho Radwan (2007) relata que o alcalóide caulerpina possui atividade antiedematogênica no edema de orelha induzido por capsaicina, neste mesmo trabalho o autor destaca ainda a reserpina, um alcalóide indólico com boa atividade anti-inflamatória.

A estimulação do TRPV1 pela capsaicina em neurônios sensitivos de ratos é potencializada pela PGE2 devido a ativação da PKA (GU et al., 2003). Demonstrou-se recentemente que a interação funcional do receptor TRPV1 com a PGE2 pode

ocorrer também através da via de sinalização da PKC, no entanto, pela ativação do receptor EP1 (MORIYAMA et al., 2005).

Sendo assim, investigamos a atividade antiedematogênica do NST no edema de pata induzido pela prostaglandina E2 (PGE2). A PGE2 é produzida pela quebra do ácido araquidônico pelas ciclo-oxigenases, e é liberada seguidamente após a sua síntese, desempenha a sua função biológica por ativar receptor (EP) acoplado a proteína G. A heterogeneidade nas funções biológicas da PGE2 é conferida à sua ligação pelo menos a quatro subtipos diferentes de receptores EP que por sua vez expressam seus sinais através de alteração do cálcio intracelular (Ca^{2+}) ou modificações dos níveis de adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) (DEWITT, 1991).

Dessa forma, a PGE2 é responsável pela ativação de várias cinases que modulam uma série de funções celulares, podendo levar a uma resposta inflamatória caracterizada pelo extravasamento de plasma, dor e febre (DEY et al., 2006). Das três isoformas existentes de COXs, a COX-2 é a única que pode ser induzida por estímulos inflamatórios como carragenina, zimosan e LPS (SCHLACHETZKI et al., 2010). Os resultados obtidos no edema de pata induzido pela injeção de PGE2 em camundongos mostram que esta substância inibiu o edema de maneira semelhante à indometacina. Estes dados revelam que a substância inibiu a ação da PGE2 e que esse efeito inibitório pode ser devido à ligação direta do NST ao receptor da PGE ou ainda bloquear pontos na via de sinalização induzida pela PGE2.

Dando continuidade aos protocolos experimentais e sabendo que o NST apresentou atividade antiedematogênica em diferentes modelos experimentais, buscamos averiguar a atividade anti-inflamatória do NST, e para isso começamos com a execução do protocolo de desgranulação de mastócitos em camundongos.

Nos vertebrados, os mastócitos estão largamente distribuídos pelos tecidos vascularizados, próximos a superfícies expostas ao ambiente externo, como a pele, vias respiratórias e o trato gastrointestinal. Os mastócitos estão bem posicionados para atuar como uma das primeiras células do sistema imune a interagir com antígenos e toxinas ambientais, ou patógenos invasores (GALLI; TSAI, 2010).

Quando aderidos ao tecido conjuntivo, os mastócitos possuem conformação ligeiramente alongada ou arredondada quando isolados na cavidade peritoneal. Seu citoplasma é rico em grânulos eletrodensos, eles possuem núcleo grande, central e arredondado que se coram metacromaticamente por corantes básicos, como o azul de toluidina (METCALFE et al., 1997; DVORAK, 2005).

A degranulação mastocitária ocorre provavelmente por ativação de uma proteína G de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP), com ativação imediata de uma fosfolipase C exclusiva para o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) que em seguida catalisa a liberação de IP₃ e DAG do PIP₂ de membrana. O IP₃ favorece o aumento nos níveis intracelulares de cálcio, que subsequentemente ativa a fosfolipase A2, seguidamente, o complexo cálcio-calmodulina ativa a quinase de cadeia leve de miosina. Nas células mastocitárias, o resultado desta ativação é a formação de mediadores lipídicos (PG e TX) e a exocitose dos grânulos ricos em histamina, catepsina e carboxipeptidases; além de iniciarem processos de transcrição, e secreção de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e TNF- α (COSTA; WELLER; GALLI, 1998).

Os resultados mostram que nos grupos tratados com NST o percentual de mastócitos degranulado foi menor quando comparado ao grupo veículo. Isso pode estar relacionado com a estabilização das membranas mastocitárias pelo NST, que impede a exocitose de mediadores inflamatórios.

Corroborando com nossos resultados, Barbosa-Filho et al. (2006) mostraram em seu trabalho que vários alcalóides indólicos apresentaram atividades anti-inflamatórias em diferentes modelos experimentais, principalmente o edema de pata induzido por carragenina, dextrana e histamina. De acordo com os autores, a atividade anti-inflamatória destes compostos está diretamente relacionada a efeitos vasculares por inibir diferentes mediadores entre eles as cininas, prostaglandinas e aminas vasoativas como por exemplo, histamina liberada pelos mastócitos.

Outros parâmetros de suma importância na resposta inflamatória são a migração de células leucocitárias para o local da inflamação, o extravasamento de proteínas para o tecido ou exsudato e a liberação de citocinas (MEDZHITOV, 2010), e para avaliar tais parâmetros utilizamos o modelo experimental de peritonite induzida por carragenina em camundongos.

A carragenina administrada por via intraperitoneal induz um aumento sustentado da permeabilidade pós-capilar, favorecendo um aumento na infiltração celular, em especial dos neutrófilos (MALECH; GALLIN, 1987). Desta forma, este modelo de inflamação aguda possibilita a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente citocinas e quimiocinas (BROOKS; DAY, 1991). Muitos pesquisadores utilizam este

ensaio experimental devido possibilitar uma avaliação tanto dos eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1997).

Com relação aos eventos celulares a análise da presença de leucócitos é de suma importância para justificar a instalação da resposta inflamatória. Os neutrófilos são células cruciais que têm papéis importantes em praticamente todas as doenças inflamatórias, que vão desde aguda, crônica, autoimune, infecciosa, e as condições não infecciosas (KOLACZKOWSKA, 2013). Os neutrófilos constituem as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o tecido, com o objetivo de eliminar o agente patogênico e favorecer a recuperação tecidual. No entanto, a sua permanência no tecido pode promover sérios danos contribuindo para a instalação do processo inflamatório crônico (MEDZHITOV, 2010).

Os animais pré-tratados com o NST apresentam redução significativa do número de leucócitos no exsudato peritoneal. Este fato pode contribuir para a recuperação do processo inflamatório. A literatura mostra que a depleção de neutrófilos suprimiu significativamente a inflamação no modelo de gota induzida por cristais de ácido úrico, isso sugere que a sua inibição pode ser um novo alvo para a reversão do processo inflamatório (FLAVIO; VERRI JR, 2016). Além do mais, os neutrófilos recrutados também produzem diferentes interleucinas como a IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 que contribuem para potencializar a resposta inflamatória (MARTIN, 2009).

Os resultados mostram que o NST também diminuiu a quantidade de proteínas totais no lavado peritoneal, isso corrobora com resultados anteriores, onde foi demonstrado que o NST inibiu os edemas induzidos por diferentes agentes flogísticos. SILVA et al., (2013) demonstraram em seus estudos que o alcalóide indólico caulerpina, inibiu a migração total de leucócitos e de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.

Como o NST apresentou atividade antiedematogênica na fase inicial e tardia no edema de pata induzido por carragenina, e nos demais modelos edematogênicos aqui testados resolvemos investigar os possíveis mecanismos envolvidos.

Sendo assim, analisamos a atividade moduladora do NST diante de complexos enzimáticos importantes como a mieloperoxidase (MPO), catalase (CAT) e ainda as concentrações de nitrito (NO), e espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico.

A mieloperoxidase é descrita como uma proteína com propriedades pró-inflamatórias importantes na defesa inata, sintetizada durante a diferenciação mielóide, constitui o principal componente de grânulos azurófilos do neutrófilo e contribui para a migração de neutrófilos para o local da inflamação (LAU et al., 2005).

Um parâmetro bastante usado e que fornece informações importantes, mesmo que de forma indireta, da presença de infiltração de leucócitos nos tecidos é o doseamento da concentração de MPO, sabe-se que os neutrófilos secretam três vezes mais MPO que os mononucleares (KRAWISZ et al., 1984). A MPO pode ser liberada após a ativação dos leucócitos, nos fagossomos ou no espaço extracelular, quando liberada a MPO pode reagir com o peróxido de hidrogênio formado pela NADPH oxidase, e aumentar o potencial tóxico deste oxidante. O complexo hidropéroxido-MPO pode promover a oxidação de várias substâncias, dentre elas o cloreto, a tirosina e o nitrito, favorecendo a formação de ácido hipocloroso, radicais tirosina, e outros intermediários reativos de nitrogênio. Esses compostos formados favorecem o mecanismo de defesa contra micro-organismos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; FLEMMIG, 2010).

Sendo assim, substâncias que inibem a MPO podem apresentar importante atividade anti-inflamatória (PASSOS et al., 2007). Pois, a presença de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação (CROSS et al., 2003). Posto isso, resolvemos averiguar se o NST reduziria a concentração da MPO no fluido peritoneal, desse modo, o pré-tratamento dos animais com NST, assim como ocorreu com o grupo tratado com indometacina, reduziu a concentração da MPO, sugerindo atividade anti-inflamatória do NST neste processo.

Relatos da literatura mostram que alcalóides indólicos inibiram concentrações de MPO em processos inflamatórios (BENSALEM et al., 2014). Jantschko et al. (2005) mostraram que substâncias como a 5-fluoro triptamina, 5-cloro triptamina, e grande parte de compostos indólicos derivados da triptamina, atuam também como excelentes inibidores da MPO.

Dando continuidade aos estudos foi avaliada a atividade enzimática da catalase no modelo de peritonite induzido por carragenina. As células leucocitárias e as células teciduais lesadas liberam várias substâncias oxidantes e enzimas que promovem o estresse oxidativo, favorecendo o aparecimento de espécies reativas

de oxigênio e nitrogênio. Estes agentes oxidantes estimulam a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, dímero e AP-1, favorecem ainda a perda dos estoques energéticos celulares, principalmente por destruição de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, que podem levar a danos nas membranas celulares e seguidamente danificar o núcleo celular alterando a expressão gênica. A exacerbação dos fatores de transcrição favorece a produção de substâncias gênicas que codificam enzimas como a catalase, que possui a capacidade de eliminar radicais livres degradando peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (WENTEN et al., 2009), colagenase e estromelina que promovem o reparo tecidual, a produção de citocinas, a proliferação de receptores de superfície celular, moléculas de adesão, e de outros mediadores inflamatórios (COOB et al., 1996).

Diante do exposto, foi realizado a análise enzimática para investigar a atividade do NST sobre a enzima catalase. A catalase tem sido apontada como indutora da iNOs e COX-2 através da via do NF- κ B, mas o mecanismo ainda não foi elucidado (JANG et al., 2004). No entanto Jang et al, (2005) discutem em seu trabalho que a expressão de COX-2 e iNOs induzida por catalase é em parte mediada pela transcrição de COX-2 e iNOs através da ativação de NF- κ B. Tal via de ativação do NF- κ B exerce ação contrarreguladora diante de baixas concentrações de radicais livres inibindo a expressão de catalase (MORGAN; LIU, 2011). O tratamento dos animais com NST nas maiores doses ou indometacina diminuiu significativamente a atividade da catalase, este fato pode estar relacionado com a diminuição de células leucocitárias no exsudato peritoneal, pois boa parte dessa enzima antioxidante é produzida pelas mitocôndrias, principalmente dos leucócitos (CADENAS; DAVIES, 2000). Como foi mostrado anteriormente, o NST diminuiu a migração de leucócitos no exsudato peritoneal, conseqüentemente, o número reduzido de leucocitos favorece a recuperação da lesão. Isso corrobora com o resultado obtido no doseamento da catalase.

Em seguida, analisamos a atividade do NST sobre as concentrações de nitrito no exsudato peritoneal. O NO é um radical livre de vida relativamente curta cerca de 10 segundos, que está envolvido em diversos processos biológicos. É comumente conhecido como o fator relaxante derivado do endotélio e também responsável por regular o fluxo sanguíneo vascular, promovendo a vasodilatação (IGNARRO, KADOWITZ, 1985). Contudo, o NO regula diversos outros processos, tais como a

potenciação em longo prazo da neurotransmissão, a motilidade gástrica, cicatrização de feridas, respiração mitocondrial, apoptose e inflamação (LO FARO et al., 2014).

A literatura mostra que o NO tem propriedades pró e anti-inflamatórias. O equilíbrio entre os dois depende de "onde" e "quanto" o NO é produzido. Uma pequena quantidade de NO derivado da eNOS é benéfico, porque inibem a adesão e migração de células inflamatórias (LAROUX et al., 2001). Em contraste, as quantidades relativamente grandes de NO produzido por iNOS após estimulação por lipopolissacarídeos ou citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α são responsáveis para contribuir na inflamação, fazendo com que aumente a permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos para os tecidos inflamados (NAGY; BUZAS et al., 2007).

Sabendo que o NO participa de eventos patológicos associados com a inflamação, a inibição desse radical com inibidores de NOS como o L-NAME tem sido explorada como tratamento anti-inflamatório (LI; HSU, 2009).

Paradoxalmente, vários doadores de NO possuem atividade anti-inflamatória. Por exemplo, o doador de NO GEA 3175 é um agente anti-inflamatório potente por inibir a quimiotaxia dos leucócitos (LAURSEN et al., 2007). Relatos na literatura mostram que o paracetamol induz a liberação de NO e este por sua vez, diminui a gravidade do choque endotóxico induzido por LPS em ratos (MARSHALL et al., 2006). Além disso, os anti-inflamatórios não esteroidais que induzem a liberação de NO melhoram a atividade anti-inflamatória e tolerabilidade gástrica quando comparados com os fármacos comuns (KEEBLE; MOORE, 2002). Citando alguns exemplos, o furoxan-aspirina doador de NO inibe a liberação de citocinas a partir de macrófagos humanos tratados com LPS (TURNBLL et al., 2008) e o nitroflurbiprofen inibe a produção de TNF- α , IL-1 β e mieloperoxidase induzida por LPS no plasma, assim, é evidente que o papel de NO na inflamação é complexo e variado (ANUAR et al., 2006).

Passou-se a investigar a ação do NST sobre a concentração de óxido nítrico no exsudato da peritonite de camundongos. Fatores como baixa concentração e meia-vida extremamente curta dificultam a dosagem do NO em amostras biológicas (GRAU et al., 2007). Desse modo, a determinação indireta pode ser feita por dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito (SUN et al., 2003). Dentre os métodos indiretos, o de Griess é o mais difundido e aqui utilizado. Nossos resultados demonstram que o NST diminuiu significativamente as concentrações de nitrito (NO^{2-}) nas doses de 100 e 200 mg/kg. Alcalóides indólicos isolados da raiz da *Isatis*

indigotica Fort, apresentaram atividade anti-inflamatória por inibir a produção de NO (KIM et al., 2004). A fração alcalóide da *Alstonia scholaris* L incluindo picrinina, valesamina e escolaricina, substâncias que contêm o núcleo indólico em sua estrutura, também apresentaram atividade anti-inflamatória por inibir a síntese de NO e PGE2 (ALOLGA et al., 2015).

O passo seguinte foi analisar a peroxidação lipídica, visto que este fenômeno é bastante prejudicial ao organismo, pois favorece reações dos radicais livres ampliando os danos celulares (CATALÁ, 2009). Niki et al. (2005), relatam que a peroxidação lipídica pode estar diretamente relacionada com o surgimento de doenças como aterosclerose, artrite reumatoide, catarata, e várias desordens neurodegenerativas como doença de Alzheimer (ARIMON et al., 2015).

Vários aldeídos de pequeno peso molecular tais como a acroleína, o malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) são formados como produto secundário durante o processo de peroxidação lipídica, estes aldeídos são considerados segundos mensageiros tóxicos por reagirem com grupos lisina, cisteína e histidina favorecendo lesões proteicas (NIKI, 2009). Os produtos resultantes da peroxidação lipídica são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B e conseqüentemente, induzem a transcrição de fatores pró-inflamatórios favorecendo o desenvolvimento de doenças inflamatórias (YADAV; ROMANA, 2013).

Dessa forma, avaliou-se o dano causado pelo estresse oxidativo inflamatório sobre a peroxidação lipídica por meio da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) determinada pela formação de complexos em alta temperatura e baixo pH entre o ácido tiobarbitúrico e componentes reativos a ele, principalmente o malondialdeído (LIMA; ABDALLA, 2001). Neste estudo, os animais tratados com NST, nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram concentração significativamente menor de TBARS comparados ao grupo veículo. Corroborando com nosso trabalho Andreadou et al. (2002) mostrou que animais tratados com diferentes substâncias contendo núcleos indólicos apresentaram redução nas concentrações de MDA em tecido cardíaco submetido a procedimento isquêmico.

Outros estudos mostram que alcaloides indólicos como 16-formil-alfa-metoxistrictamina, tubotaivina e picralinal inibiram a exsudação no modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos. Estes alcaloides inibiram as concentrações de mediadores inflamatórios, como NO, PGE2 e malondialdeído na

inflamação induzida pela carragenina, no modelo experimental da bolsa de ar, também em camundongos (SHANG et al., 2010).

Diante dos resultados favoráveis do NST na ação antiedematogênica no edema de pata induzido por carragenina, buscamos avaliar a sua atividade sobre outro modelo de inflamação aguda como no teste de incapacitação articular induzido por carragenina. Para estudar os mecanismos patológicos da dor artrítica, vários modelos experimentais que simulam a artrite humana foram desenvolvidos (YU et al., 2002). Nesse estudo foi utilizado o modelo de incapacitação induzido por carragenina. Este teste foi avaliado através da incapacitação articular usando como medida a perda da funcionalidade mediante processo inflamatório (*functio laesa*), essa técnica é bastante utilizada para triagem de possíveis fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

A indução de artrite por injeção intra-articular de carragenina apresenta padrão de desenvolvimento semelhante ao apresentado para o edema de pata induzido pelo mesmo agente, a administração de carragenina na cavidade articular promove já nas primeiras horas, a síntese e liberação de mediadores inflamatórios que induzem edema e uma rápida infiltração de granulócitos polimorfonucleares, sendo assim, a incapacitação ocorre devido a uma sensibilização da articulação, manifestada pela retirada do membro quando a articulação inflamada é pressionada (hiperalgesia mecânica) (SANTER et al., 1983).

No final da década de 70, Castro e colaboradores (1979) mostraram que os neutrófilos apresentavam atividade pró-nociceptiva. Vários trabalhos discutem a fisiopatologia do edema intra-articular induzido por carragenina e afirmam que a mesma além de liberar mediadores endógenos como histamina, serotonina, bradicinina e TNF- α na fase inicial da inflamação, também aumenta os níveis de prostaglandinas mais tardiamente, e ainda favorece a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Di ROSA, 1971; MATSUMOTO et al., 2015).

Em 1985 Levine e colaboradores mostraram que a administração de LTB₄ na pata de rato induzia hipernocicepção mecânica dependente diretamente da migração de neutrófilos. Os autores discutem ainda que para ocorrer hipernocicepção dependente de neutrófilos, os mesmos precisam ser ativados. Quando os neutrófilos são recrutados utilizando glicogênio não ocorre o fenômeno da hipernocicepção, no entanto, quando neutrófilos são ativados com

lipopolissacarídeo ou carragenina o estado de hipernocicepção é imediatamente estabelecido.

Neste modelo de incapacitação articular induzida por carragenina, o NST foi efetivo na redução do tempo de elevação da pata (TEP). Os animais tratados com NST apresentaram diminuição da incapacitação articular a partir da primeira hora após a administração da carragenina, sendo o grupo tratado com NST 100 mg/kg o que apresentou maior inibição no parâmetro avaliado. De acordo com o resultado é possível sugerir que o NST atue por inibir a migração de leucócitos e as citocinas pro- inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α ou ainda a liberação de mediadores endógenos como histamina e serotonina como discutido anteriormente.

Mohamed et al. (2007) mostram em seu trabalho que substâncias contendo núcleo indólico apresentaram atividade antiedematogênica e anti-inflamatória por inibir as enzimas ciclo-oxigenase e 5-lipoxigenase, que convertem ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos.

Os autores discutem ainda que o núcleo indólico, presente em varias substâncias principalmente nos alcalóides, metabólitos secundários de plantas, vem apresentando vasta atividade biológica, como anti-inflamatória, anticonvulsivante, cardiovascular e antibacteriana. Estes dados somam àqueles citados em nossos resultados, quando foi afirmado que o NST diminui o TEP quando comparado ao grupo veículo.

Dando continuidade aos experimentos resolveu-se avaliar a atividade do NST na artrite gotosa induzido por cristais de ácido úrico. O acometimento da gota é uma resposta inflamatória aguda que normalmente ocorre nas articulações. É um processo inflamatório iniciado pela deposição de cristais de urato monossódico (MSU) no tecido circundante (CODERE; WALL, 1987; NEOGI, 2011). As opções terapêuticas para o tratamento da artrite gotosa incluem fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINE), colchicina em (dose baixa) e glicocorticoides intra-articular. No entanto, os AINEs são responsáveis por uma gama de efeitos colaterais, dentre os mais comuns têm-se úlceras gastrointestinais, sangramento e disfunção renal, a colchicina pode induzir diarreia, os corticoides por sua vez, pode induzir hiperglicemia, retenção de líquidos e alteração de humor (LEE et al., 2013).

Clinicamente, a gota é associada com edema e eritema nas articulações, bem como dor severa. Vários estudos indicam que a injeção intra-articular (IA) de cristais de urato provocam sintomas semelhantes aos observados nas manifestações

clínicas da gota (CODERE, WALL, 1987, GETTING et al., 2002). Martin et al, (2009) relataram que a administração intra-articular de MSU induz edema nas articulações, dificuldade de movimento, comportamentos nociceptivos incluindo alodinia mecânica e infiltração intensa de neutrófilos no tecido e no fluido das articulações, na membrana sinovial e ainda induz a expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, TNF- α responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória. Miyasaka (1997) e Chen et al., (2004) mostraram que o MSU pode regular positivamente a expressão de proteínas pró-inflamatórias, iNOS e a expressão de COX-2 em monócitos e macrófagos, dessa forma favorece a expressão de prostaglandina e óxido nítrico observados na artrite gotosa.

Nesse modelo experimental observou que a administração de MSU nos animais induziu edema nas articulações, diminuiu o limiar de retirada da pata logo nas primeiras quatro horas após a indução da artrite. Outros aspectos da resposta inflamatória foram observados, incluindo acúmulo de neutrófilos e o tamanho da articulação (**Figura 29**). Estudos mostram o influxo de neutrófilos para fluido articular em torno das 16 a 24 h após a injeção de MSU intra-articular bem como a intensa infiltração na camada de revestimento superficial e subsinovial da sinóvia por leucócitos (principalmente neutrófilos) nas primeiras 24 horas (NISHIMURA et al., 1997, GETTING, et al., 2002). De forma semelhante, o presente trabalho constatou que a administração de cristais de urato monossódico aumentou significativamente a infiltração de leucócitos em especial os neutrófilos no tecido periférico à articulação tíbio-társica (**Figura 28**). O aumento da infiltração dos neutrófilos foi acompanhado por edema e nocicepção (**Figura 26 e 27**).

A administração intraperitoneal de NST nas doses de 100 e 200 mg/kg reduziram de forma significativa o edema e a gravidade da alodinia mecânica, pois os animais submetidos ao tratamento com NST apresentaram diminuição da incapacitação articular a partir das primeiras quatro horas após a administração dos cristais de ácido úrico, o que se perdurou por todo tempo de observação. É possível sugerir que o NST atue por inibir (assim como em modelos anteriores) a migração de leucócitos o extravasamento vascular e a liberação de agentes edematogênicos como a histamina e a serotonina para o sítio inflamatório. O NST também atenuou significativamente a infiltração de leucócitos induzida por MSU (**Figura 28 e 29**).

Segundo Fattori, Amaral e Verri Jr (2016), inibir o recrutamento de neutrófilos, para a região inflamatória é de fundamental importância para a reversão

da artrite induzida por cristais de ácido úrico. Sabe-se que os leucócitos estão intimamente relacionados com a produção de vários agentes pró-inflamatórios como as IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 (MARTINON, PETRILLI, 2006; MARTIN, HARPER, 2009). Notavelmente, indometacina diminuiu o edema, a alodinia mecânica e a migração de leucócitos para a articulação na artrite induzida por MSU.

Corroborando com este trabalho Barbosa-Filho et al. (2006) relatam que os alcalóides indólicos é uma classe de metabólito secundário bastante estudada devido a sua atividade anti-inflamatória. Segundo o mesmo autor, eles apresentam atividade anti-inflamatória em diferentes ensaios, incluindo edema de pata induzido por carragenina, artrite induzida por diferentes agentes inflamatórios e no ensaio de permeabilidade vascular induzido por ácido acético.

Todavia, fármacos que possuem atividade depressora como o diazepam podem gerar resultados falso positivos no teste de incapacitação articular devido às alterações na coordenação e estado vigil dos animais, diminuindo o tempo de elevação da pata (TONUSSI; FERREIRA,1992). Sabendo disso, avaliamos o efeito do NST sobre a atividade exploratória e coordenação motora de camundongos submetidos a campo aberto e barra giratória (rota-rod). Os resultados obtidos não demonstraram atividade depressora do sistema nervoso central para os animais tratados com NST na dose de 200 mg/kg. Tal efeito é importante porque outros derivados indólicos apresentam atividades no sistema nervoso central (OLIVEIRA, 2006).

Os dados exibidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da ação farmacológica do NST, o qual apresentou importante atividade antiedematogênica e anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais dentre eles: edema de pata induzido por carragenina em ratos, edema de pata induzido por dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, capsaicina e prostaglandina E2 em camundongos, e modelos de inflamação, como peritonite induzida por carragenina em camundongos além da desgranulação de mastócitos em ratos, e ainda não demonstrou efeito nos testes comportamentais em rota Rod e campo aberto.

Os resultados obtidos sugerem, em suma, que o efeito anti-inflamatório do NST deve-se em parte à estabilização dos mastócitos e provavelmente à inibição da síntese, liberação ou ação da histamina e serotonina. Os dados sugerem ainda que a atividade anti-inflamatória do NST pode estar relacionada à diminuição da quimiotaxia de leucócitos para o sítio inflamatório e combate ao estresse oxidativo.

Neste contexto, os dados obtidos em nosso trabalho demonstram possível potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármaco com atividade anti-inflamatória, sendo necessários para isso, estudos mais detalhados a fim de elucidar os mecanismos de ação envolvidos.

6 CONCLUSÃO.

A investigação aqui realizada nos permite concluir que:

- ✓ A administração do NST mostrou atividade antiedematogênica ao inibir, de forma significativa, o edema de pata induzido por carragenina em ratos, bem como os edemas induzidos por dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, capsaicina e prostaglandina em camundongos,
- ✓ O NST exibiu pronunciada atividade inibitória da desgranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 em ratos.
- ✓ O NST reduziu significativamente a migração de leucócitos (total e diferencial), e ainda diminuiu a concentração de proteínas totais no exsudato de peritonite induzida por carragenina em camundongos.
- ✓ O NST diminuiu de forma significativa a atividade da mieloperoxidase, da catalase, as concentrações de nitrito (NO_2^-) e a concentração de espécies reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no exsudato de peritonite induzida por carragenina em camundongos.
- ✓ O NST reduziu de forma significativa a incapacitação articular induzida por carragenina em ratos, por diminuir o tempo de elevação da pata.
- ✓ O NST reduziu significativamente o edema, o tempo de elevação da pata e a migração de leucócitos no modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico em ratos.
- ✓ O NST não apresentou efeito sobre a coordenação motora e capacidade exploratória nos testes de campo aberto e rota-rod.

7 PERSPECTIVAS

O presente trabalho tem como perspectivas:

- Elucidar os principais mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória do NST frente à análise de western blotting para iNOS, COX-2;
- Avaliar a ação do NST sobre a transcrição de citocinas pró e anti-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 através de qT-PCR;
- Avaliar o efeito do NST em modelos de hipernocicepção induzida por ACF;
- Agregar tecnologia farmacêutica para garantir o desenvolvimento de formas farmacêuticas para uso pela via oral (comprimidos) e tópica (microemulsão) e testá-las em modelos de inflamação aguda e crônica;
- Em suma, estes resultados são importantes para a realização de estudos complementares em níveis farmacodinâmicos ou farmacocinéticos, que permitirão determinar as inter-relações da molécula no organismo vivo, ou ainda se a substância teste (NST) representará inovação no tratamento da dor e da inflamação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. N.; JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 440-452, 2010.
- AFONSO, V. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, p. 324-329, 2007.
- AGGARWAL, B. B. Inflammation and cancer. **Bloch Pharmacology**, v. 72, p.1605-1621, 2006.
- ALDERTON, W. K. COOPER, C.E R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593–615, 2001.
- ALG, C. DOMICIANO, D. S. Osteoartrite: pode terapia anti-citocina desempenham um papel no tratamento **Clinical Rheumatology**, v. 29, p. 451-455, 2010.
- ALLEN, G. M. Common native important plants in Florida's ethnobotanical history. University of Florida. **Circular 1439**, p. 1-21, 2012.
- ALLER, M. A. J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science. Monitor**, v. 12, p. 225 – 234, 2006.
- ALOLGA, R. N. Anti-inflammatory and antipyretic properties of Kang 601 heji, a traditional Chinese oral liquid dosage form, **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 921-927, 2015.
- ALVES, F.R.D.S. BARREIRO, E. J, C. A. M. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.9, p.782-793, 2009.
- ALVES, R. R. N.; SILVA, C. C.; ALVES, H. N. Aspectos socioeconômicos do comércio de plantas e animais em áreas metropolitanas do norte e nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 181-189, 2008.
- ANAND, P. K.; BLEY. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. **British Journal of Anaesthesia**. V. 107 n.4 490–502 2011.
- ANUAR, F. Flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivative protect against septic shock in rats, **Inflammation. Research** v.55 n.11 p.498–503, 2006.
- AOKI, S. et al. Novel neuronal nitric oxide synthase (nNOS) selective inhibitor, aplysinopsin-type indole alkaloid, from marine sponge *Hyrtios erecta*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 1372-1374, 2001.
- ARIMON, M.; TAKEDA, S.; KATHRYN, L. post, sarah svirsky, bradley t. hyman, oksana berezovska, oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. **Neurobiology of disease**, v.84, p.109-119, 2015.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity **Archives of Biochemistry and Biophysics**,v. 500, p. 92–106, 2010.

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

ANTMAN, E. M. Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. **Circulation**, v.115, p. 1634-1642, 2007.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Reviews of Ecology Evolution Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431 – 441, 2005.

BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. **Seminars in Cancer Biology**, v.16, p.80–88, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 1, p. 109-139, 2006.

BARNES, P. J.; PEDERSEN, S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma. **American review of respiratory disease**, v.148, p.1–26.1993.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers **Biochemical pharmacology**, v. 77, p. 1303-1315, 2009.

BENOIST, C. L. D.; FEUERER, M. S. Y.; MATHIS. D. How punctual ablation of Foxp3+ T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. **Immunity**, v. 31, p. 654-656, 2009.

BENSALEM, S. S. Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, v.154, p. 361-369, 2014.

BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 883–8, 2002.

BHATI, S. K.; KUMAR, A. Synthesis of new substituted azetidinoyl and thiazolidinoyl-1,3,4- thiadiazino (6,5-b) indoles as promising anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2323–2330, 2008.

BIANCHI, M. E.; CELONA, B. Ancient news: HMGBs are universal sentinels. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 116–117, 2010.

BOER, B.; WETTEN, V. L. Pruiomboom, Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. **Nutrition and Metabolism**, v.32, 2012.

BOLLING, Bradley W. et al. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, v. 124, p.1-6, 2011.

- BORK, K. Angioedema. **Immunology and allergy clinics of North America** v.34, n. 1, p. 23-31, 2014.
- BOUAYAD, N. Dietary effects of harmine, a carboline alkaloid, on development, energy reserves and a amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner [Lepidoptera: Pyralidae. Saudi. **Journal of Biological Sciences**, v.19, n.1, p.73-80, 2011.
- BRADLEY, P. P. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**. v.78, p.206–209, 1982.
- BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe- and danger-induced inflammation. **Molecular Immunology**, v. 63, p. 127–133, 2015.
- BROOKS, P. M.; DAY, R. O. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differences and similarities. **New England Journal of Medicine** v. 324, n. 24, p. 1716-25, 1991.
- BOOTHE, D. M. Anti-inflammatory drugs. In: 40 *Ciência Animal*, 15(1):33-41, 2005.
- BOOTHE, D.M. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Philadelphia: **Saunders Company**, p. 281-311, 2001.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.
- BUCKLEY, G. C. D. et al. The resolution of inflammation, **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 59–66, 2013.
- BUENZ, E. J. Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n.9, p. 494-498, 2004.
- BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics** v. 107, p. 139 – 154, 2005.
- BHUWAN, B.; MISHRA, VINOD, K. TIWARI, Natural products: An evolving role in future drug discovery, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, 10, p. 4769-4807, 2011.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, **Free Radical Biology & Medicine**, v.29 p.222–230, 2000.
- CASTRO, M. S. A.; FERREIRA, S.H. Cell migration and hyperalgesia: a paradoxical effect of endotoxin. **Advances in inflammation research**, v.1, p.311–316, 1979.
- CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Analytical Bioanalytical Chemistry**. v.376, p.33-37, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CASTARDO, J. C., et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-411, 2008.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v 389 p. 816-824, 1997.

CATERINA, M. J. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p.816-824 1997.

CESARE, P. et al. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, v. 23, n.3, p.617-624, 1999.

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

CHEN, G. Y; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, p. 827-837, 2010.

CHEN, L.; YANG, G, GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain, **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 58-66, 2013.

CODERRE, T.J.; WALL, P.D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: An alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain** v.28, p.379–393, 1987.

CHOI, Y.H. Anti-inflammatory principles from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cellular action mechanisms. **Archives of Pharmacal Research**, v.29, p.293–7, 2006.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, N. Engl. **Journal Medical**, v.344, p. 907–916, 2001.

CHEN, L.; HSIEH, M.S.; HO, H.C.; LIU, Y.H.; CHOU, D.T.; TSAI, S.H. Stimulation of inducible nitric oxide synthase by monosodium urate crystals in macrophages and expression of iNOS in gouty arthritis. **Nitric Oxide**, 11, 228–236, 2004.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5) P2-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 957-962, 2001.

CONKLIN, K. A. Cancer chemotherapy and antioxidants, **Journal of Nutrition**, v.134, n. 11, p. 3201S–3204S, 2004.

COOB, J. P. Mechanisms of cell injury and death. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, p. 3-10, 1996.

COSTA, J. J.; WELLER, D. F.; GALLI, S. J. As células da resposta alérgica: mastócitos, basófilos e eosinófilos. **JAMA Brasil**, v.2, n. 5, p. 268-278, 1998.

COSTA, A. F. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p.502-505, 2010.

CROFFORD, L. J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.15 p.1-10, 2013.

CROSS, A. S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T. K.; DRYSDALE, B. E.; GRANGE, P. A.; CASSELS, F. J.; WANG, L. X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A. K.; KLEINBERG, M.; GOLDBLUM, S. E. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. **Journal of Biological Chemistry**. v.278 p.4112-4120, 2003.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 392 – 402, 1971.

CRUVINEL, W. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 50, p. 434-61, 2010.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia**. ESALQ/USP, 2005. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf. Acesso em: 24 out. 2015.

CUZZOCREA, S. et al. Cloricromene, a coumarine derivative, protects against collagen-induced arthritis in Lewis rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 1399– 1407, 2000.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, p. 201-204, 2000.

DE CATERINA, ZAMPOLLI, R. A. From asthma to atherosclerosis–5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation, **The New England journal of medicine**. v. 350 p.4–7, 2004.

DEDON, P. C.; TANNENBAUM, S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 12–22, 2004.

DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1083, n. 2, p. 121-34, 1991.

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 6, p. 611–623, 2006.

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

DIAS, J. P. S. **A Farmácia e a História**: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacacia-e-Historia.pdf>>. Acesso em: 10 dezembro 2015.

DONG-KYU, L., et al. Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS, **Food Chemistry**, v.141 p. 3931-3937, 2013.

DORWARD, D. A., et al. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. **Pharmacology & Therapeutics**, v.135, p.182–199, 2012.

DVORAK, A.M. New aspects of mast cell biology. **International Journal of Neuroscience**, v. 59, p. 91, 1991.

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYAY, D.; ZEGGWAGH, N. A. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 01-14, 2012.

ERUSALIMSKY, J. D.; MONCADA, S, Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology, *Arterioscler.* **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, 2007.

ESCH, R. W.; KOOL, M. M.; AS, S.; NSAIDs can have adverse effects on bone healing. **Medical Hypotheses**, v. 81, p. 343–346, 2013.

ÉVERTON, T.S, et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v.7, p. 689- 704, 2009.

FATTORI V. A; WALDICEU, F V A. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological Research** <http://dx.doi.org/10.1016>. 2016.

FARSAM, H. Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p.443- 447, 2000.

FATTAKHOVA, G., et al. The high-affinity immunoglobulin-E receptor (Fc_γRI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. **Traffic**, v.7, p.673-685, 2006.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infection**, v. 5, p. 1317 – 1327, 2003.

FERNANDES, E.; et al. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole and oxazole derivative drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 11, p. 1895-1905, 2004.

FIGUEIREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JÚNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FILGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de caminha. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FIOCCHI, C, Inflammatory bowel disease: dogmas and heresies. **Digestive Liver Disease**, v. 34, p.306–311, 2002.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B.E.; HU, J. W. Capsaicin-induced inflammation within temporomandibular joint involves VR-1receptor mechanisms **Journal of Dental Research**, v.79; p. 321, 2000.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The COXIBS, selective inhibitors of cyclooxygenase- 2. **New england journal of medicine**, v. 345, p. 433-442, 2001

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Molecular aspects of Medicine**, v. 22, p. 189-206, 2001.

FATTORI, V. A. F. AMARAL, WALDICEU A. VERRI JR., Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives, **Pharmacological Research**, 2016.(artigo no prelo)

FLAVIO A V, F., VERRI JR, A. W. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological Research**. 2016. artigo no prelo)

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 07, 2006.

GABOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapeste: Akadémiai Kiadó, **Prostaglandins**, v. 50, p. 161- 168, 2000.

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. **European Journal of Immunology**, v.40, p.1843-1851, 2010.

GAMSÉ, R.; HOLZER, P.; LEMBECK, F. Decrease of substance P in primary afferent neurons and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **British Journal of Pharmacology**, v. 68, p. 207-213, 1980.

GETTING, S.J.; CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis. **Arthritis Rheumatology** v.46, p.2765–2775, 2002.

GHOSH, M. N.; SINGH, H. Inhibitory effect of a pyrrolizidine alkaloid, crotalaburnine, on rat paw oedema and cotton pellet granuloma. **British Journal of Pharmacology**, v.51, n. 4, p. 503-8, 1974.

GOMES, R. P. **Atividade física no tratamento da artrite induzida por adjuvante de Freund**: efeitos na nocicepção, edema e migração celular. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2008.

GONG, Y. YU.; B. YANG, W. ZHANG, X. Phosphorus, and nitrogen co-doped carbon dots as a fluorescent probe for real-time measurement of reactive oxygen and nitrogen species inside macrophages. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p.822-828, 2016.

GREEN, L.C.; et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GRISHKO, V. I; et al. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, p. 107-113, 2009.

GU, Q., KWONG, K., LEE, L.Y. Ca^{2+} transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE2 in vagal sensory neurons: role of cAMP/PKA signaling pathway. **Journal Neurophysiology**, v .89, n. 4, p. 1985-1993, 2003.

GUALILLO, O. E. S., et al. Evaluated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 213–8, 2001.

GUAN Y, et al. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. American journal of physiology. **Renal, fluid and electrolyte physiology**, v. 273, p. 18–26 , 1997.

GUO, Y.; et al. Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: A microdialysis study. **European Journal of Pharmacology**, v.331, n. 2-3; p. 237-43, 1997.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

GUTIERREZ, S. J. C., CLAUDINO, S. F, BAGNÓLIA, A. S., CÂMARA, C. A. ALMEIDA, R, N, M V. DE FÁTIMA DA SILVA, M. S. DA-CUNHA, E V.L BARBOSA-FILHO. J M. *Nb*-benzoyltryptamine derivatives with relaxant activity in guinea-pig ileum. **II Farmaco**, v. 60, p. 475-477, 2005.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals Epidemiology**, v.15, p. 686–699, 2005.

HANOSOVÁ, H. K. Improving field production of ergot alkaloids by application of gametocide on rye host plants. **New Biotechnology**, v. 32, p. 739-746, 2015.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N.Engl. New England Journal of Medicine*, v. 352, p. 1685–1695, 2005.

HE, M., ZHANG, J. Evaluation of four commercial biuret reagent kits of serum total protein by the American Association for Clinical Chemistry reference measurement procedure. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 6, p. 989-92, 2011.

HENEKA, M.T.; BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. **Journal Neuroimmunology**, v.184, p.69–91, 2007.

HENROTIN, Y; KURZ, B; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **OsteoArthritis and Cartilage**, vol. 13, p. 643-654, 2005.

HIFNAWAY, M. S.; CAVÉ, A. Produits neutres et alcaloïdes de *Myrtopsis macrocarpa*, *M. myrtoidea*, *M. novae caledoniae sellingii*. **Phytochemistry**, v.16, p.1035-9, 1957.

HORDONHO, A. A. C. **Componentes da síndrome metabólica em portadores de obesidade mórbida, segundo diferentes níveis de uricemia**. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/123456789/474>. Acessado em: 14 nov. 2014.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E., et al. Ultra high performance liquid chromatography–time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: Method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees. **Journal of Chromatography**, v. 1218, p. 7723–7738, 2011.

IGNARRO, L. J. KADOWITZ, P.J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation, **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.25 p.171–191, 1985.

INSTITUT-PASTEUR. **Cytokines and Inflammation**. Disponível em: <https://research.pasteur.fr/en/team/cytokines-and-inflammation/> Acesso em: 15 de novembro de 2015.

ISLAM, S., et al. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF-κB–Inhibitory Activities of Phytosteryl Ferulates: Structure–Activity Studies. **Journal Pharmacology Science**, v. 111, p. 328 – 337, 2009.

JANCSO, N.; JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. **British Journal Pharmacology**, v. 33, p.32-41, 1968.

JANG, B.; PAIK, J.; KIM, S.; BAE, J.; MUN, K.; SONG, D.; CHO, C.; SHIN, D.; KWON, T. K.; PARK, J.; PARK, J.; BAEK. W.; SUH, M.; LEE, S. H.; BAEK, S.; LEE, I.; SUH, S. Catalase induces the expression of inducible nitric oxide synthase through activation of NF-κB and PI3K signaling pathway in Raw 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 2167–2176, 2004.

JANG, B.; PAIK, J.; KIM, S.; SHIN, D.; SONG, D.; PARK, J.; SUH, M.; PARK, J.; UH, S. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. **Cellular Signaling**, v. 17, p. 625–633, 2005.

JANSSEN, J. W.; HENSON, P. M. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. **Toxicologic Pathology**, v. 40, p. 166-173, 2012.

JASWIR, I.; MONSUR, H. A. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.33, p.7146-7154, 2011.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1786-800, 2009.

JANG, B.; PAIK, J.; KIM, S.; SHIN, D.; SONG, D.; PARK, J.; SUH, M.; PARK, J.; SUH, S. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. **Cellular Signaling**, vol. 17, p. 625–633, 2005.

KANTERMAN, J.; SADE-FELDMAN, M.; BANİYASH, M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. **Seminars in Cancer Biology**, v.22, p.307– 318, 2012.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology** v.13, p.159-175, 2013.

KARAASLAN, C. SUZEN, S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases, Curr. Top. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 894–903, 2015.

KAUSHIK, N. K. Biomedical Importance of Indoles **Molecules**, v.6 p.6620-62, 2013.

KEEBLE, J. E. MOORE, P. K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs, Br. **Journal Pharmacology**, v.137, n. 3, p. 295–310, 2002.

KERBER, V. A., et al. Psychollatine, a Glucosidic Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria umbellata*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 4, p. 697-700, 2008.

KIM, D. C.; YEO, S. D. Modification of indomethacin crystals using supercritical and aqueous antisolvent crystallizations, **The Journal of Supercritical Fluids**, v.108, p. 96-103, 2016.

KIM, J. S., et al. Chemical constituents from the root of *Brassica campestris* ssp. *rape*. **Korean Journal Pharmacognosy**, v. 63, p.35:259, 2004.

KOVAC, S., et al. Seizure activity results in calcium- and mitochondria-independent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation. **Cell Death Disease**, v.5, p.1442, 2014.

LAMMERMANN, T., et al, Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo, **Nature**, v.498, p.371–375, 2013.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal Cellular Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211-1220, 2009.

LAROUX, F. S., et al. Role of nitric oxide in inflammation, **Acta Physiologica**, v.173, n.1, p.113– 118 2001.

LASKIN, J. D.; HECK, D. E.; LASKIN, D. L. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation, **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.5, n. 9, p.377–382, 1994

LAU, D., et al. **Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with.** 2005.

LAURSEN, B. E., Potential protective properties of a stable, slow-releasing nitric oxide donor, GEA 3175, in the lung, **Cardiovasc. Drug Revivs**, v. 24, n. 3-4, p. 247–260, 2006.

LAWENDA, B. D. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy. **Journal of the National Cancer Instute**, v. 100, n. 11, p. 773–783, 2008.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution. **Internetonial Journal Experimental Pathology**, v.88, p.85–94, 2007.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LEE, B .C.; LEE, J., Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, p. 446–462 , 2014.

LEE, I. et al. YANG, C. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 581–590, 2012.

LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and Type 2 Diabetes, **Arch. Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p.208–222, 2013.

LEE, H.P. HUANG, S.Y., LIN, Y.Y., WANG, H.M., JEAN, Y.H., WU, S.F., DUH, C.Y., WEN, Z.H., Soft coral-derived lemnalol alleviates monosodium urate-induced gouty arthritis in rats by inhibiting leukocyte infiltration and iNOS, COX-2 and c-fos protein expression. **Marine Drugs**, v.11, p.99–113. 2013.

LEE, J. L. Cyclooxygenase in the skin pharmacological and toxicological implications. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEMBECK F, H. P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**, p. 175-183, 1979.

LEV, E. Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11–14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor–Schechter Genizah collection, Cambridge. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 275–293, 2007.

LEVINE, J.D.; GOODING, J.; DONATONI, P.; BORDEN, L.; GOETZL, E.J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **Jornal Neuroscience**, p.3025–3029, 1985.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Immunology**, p. 678-689, 2007.

LI, L.; HU, A. P. K. Moore, Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! **Pharmacology & Therapeutics**, v.123, n. 3, p. 386– 400, 2009.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 12, p. S140–S146, 2007.

LLORENS, O., et al. Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors. **Journal Molecular Graphics Modeelling**, v.20, p.359-371, 2002.

LO FARO, M., et al. sulfide and nitric oxide interactions in inflammation, **Nitric Oxide**, v. 41, n.15, p.38-47, 2014.

LUNDBERG, J. O., et al. Nitrate, bacteria and human health, **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.7, p.593–602, 2004.

LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. **PHYSYS: Revista de Saúde Coletiva**, v.15, p. 145-176, 2005.

MACGLASHAN, D. Histamine: a mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.112 p.S53–S59, 2003.

MADHUSUDANA, K., et al. Anti-inflammatory potential of thienopyridines as possible alternative to NSAIDs. **European Journal Pharmacology**, v. 678, p 48–54, 2012.

MAHESH, G.; RAMKANTH, S; SALEEN, M. Anti-inflammatory drugs from medicinal plants: a comprehensive review. **International Journal of Review in Life Sciences**, v. 01, p.01-10, 2011.

MAJNO, G. JORIS, I. C. Tissues and Disease. **Oxford University Press**, 2004.

MALAWISTA, S. E, Tonic inhibition of chemotaxis in human plasma, **Proc. Natl. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105 p.17949–17954, 2008.

MALECH, H. L., GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **New England Journal of Medicine.**, v. 317, n. 11, p. 687-94, 1987.

MANIGANDAN, V. et al. Molecular docking studies of Rhizophora mucronata alkaloids against neuroinflammatory marker cyclooxygenase 2. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v 8, p. 91–99, 2014.

MANTOVANI, A. M. A.; CASSATELLA, C.; COSTANTINI, S. Jaillon, Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity, **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.519–531, 2011.

MARSHALL, M.; KEEBLE, J.; MOORE, P. K. Effect of a nitric oxide releasing derivative of paracetamol in a rat model of endotoxaemia, Br. **Journal Pharmacology**, v. 149, n. 5, 516–522, 2006.

MARTINON, F.; GLIMCHER, L. H. Gout: new insights into an old disease. **Journal Clinical Investigation**, v. 116, p. 2073-5, 2009.

MATSUMOTO, O; SHIGEAKI K, YUKO K, J. Anti-inflammatory effects of linezolid on carrageenan-induced paw edema in rats, **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, p 889-891, 2015.

MARTIN WJ, WALTON M, HARPER J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. **Arthritis & Rheumatology**;60:281-289, 2009.

MARTIN W.J, WALTON M, HARPER J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. **Arthritis Rheumology** 2009;60:281-289.

MARTINON F, PETRILLI V, MAYOR A, TARDIVEL A, TSCHOPP J. Gout-associated uric acid crystals activate the nalp3 inflammasome. **Nature** 440:237-241, 2006.

MARTIN, W.J.; HERST, P.M.; CHIA, E.W.; HARPER, J.L. Sesquiterpene dialdehydes inhibit MSU crystal-induced superoxide production by infiltrating neutrophils in an in vivo model of gouty inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.47, p. 616–621, 2009.

MEDEIROS, M. F. T. Etnobotânica histórica, princípios e procedimentos. Recife: **NUPEEA**. 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 771-776, 2010.

MENDELSON, A. R.; LARRICK, J. W. Paradoxical effects of antioxidants on cancer. **Rejuvenation Research**, v.17, n. 3, p.306–311, 2014.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiology**, v.77, p.1033-1079, 1997.

METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 15, p. 946–956, 2008.

MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G, Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: **Robe Editorial**. 2000.

MILLER , L. C.; TAINTER, M. L. Estimation of the DL50 and its error means of logarithmic probit graph paper. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 57, p. 261-262, 1944.

MIYASAKA, N.; HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. **Life Science**. v.61, p.2073–2081, 1997.

MONTEIRO, E. C. A., et al. Os anti-inflamatórios não esteroidais. **Temas Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MORIYAMA, T., et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Molecular Pain**, v. 1, n.1, p. 1-13, 2005.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOSHAGE, H., et al. Nitrite and Nitrate Determinations in Plasma: A Critical Evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 892-896, 1995.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F; MOSES, L; GWALTNEY-BRANT, S.M. Serotonin: a review. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics** , v. 31, n. 3, p. 187-99, 2008.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Research**, v. 21, p. 103-115, 2011.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 11, p. 01-02, 2012.

MUHAMMAD, H., GOMES-CARNEIRO, M.R., POÇA, K.S., DE-OLIVEIRA, A.C.A.X., AFZAN, A., SULAIMAN, S.A., ISMAIL, Z., PAUMGARTTEN, F.J.R. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **Journal Ethnopharmacology**, 133, 647–653. 2011.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters** v.111, n. 1, p.1–5, 2007.

NAKAMURA, Y., et al. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 9, p. 997- 1007, 2003.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Review**, v.6, p.173–182, 2006.

NEGI, V. S, et al. An inventory of indigenous knowledge and cultivation practices of medicinal plants in Govind Pashu Vihar Wildlife Sanctuary, Central Himalaya, India. **International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management**, v.1, p.1–10, 2010.

NEOGI, T. Clinical practice. Gout. **New England Journal of Medicine**. v.364, p. 443–452, 2011.

NISHIMURA, A.; AKAHOSHI, T.; TAKAHASHI, M.; TAKAGISHI, K.; ITOMAN, M.; KONDO, H.; TAKAHASHI, Y.; YOKOI, K.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. **Journal of Leukocyte Biology**, 62, 444–449, 1997.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 469–484, 2009.

NIKI, Y., YAMADA, H., SEKI, S., KIKUCHI, T., TAKAISHI, H., TOYAMA, Y., FUJIKAWA, K., TADA, N. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. **Journal of Clinical Investigation**. v. 107, p. 1127–1135, 2001.

NORRBY, K. On the 48/80-induced secretion of tissue mast cells and its mitogenic effect on nearby cells in the intact rat. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Molecular Pathology*, v. 38, p. 57-65, 1981.

NORTON, S. Quantitative determination of mast cell fragmentation by compound 48/80. **British Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 494-497, 1954.

ÖLGEN, S.; NEBIOGLU, D. Synthesis and biological evaluation of N-substituted indole esters as inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). **Il Farmaco**, v. 57, p. 677-683, 2002.

OLIVEIRA, F. A. et al. Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, p. 199-202, 2001.

OLIVEIRA, F. A. et al. Synthesis and structural characterization of n-benzoyltryptamine and its new analogue n-salicyloyltryptamine, a potential anticonvulsant agent. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v 51, n. 2, p.919-922, 2006.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method. **OECD**, Paris, 2001.

OECD. **Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation**. In: OECD Series on Testing and Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Paris: OECD Publishing, 2002c. p. 39.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology review journal**. v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PASSOS, G. F., et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PEARSON, C. M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 1. p. 95-101, 1956.

PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant: I. General clinical and pathologic characteristics and some modifying factors. **Arthritis Rheumatology**, v.2, p.440–459, 1959.

PEREIRA, R. D. C. A., **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p. 1193–1200, 2008.

PEREIRA, C. Estratégias de neuroproteção: Efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de estresse oxidativo. **Acta Médica Portuguesa**, v.16, p.401-406,2003.

PINHEIRO, M. M.; FERNANDES, S.B.; FINGOLO, C.E, et al. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. **Journal Ethnopharmacol**, v.146, n. 1, p.324-30, 2013.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

POLETTO, R.; WELTER, S. C. A Materia Medica missioneira do Pedro Montenegro um estudo sobre as virtudes das plantas medicinais nativas americanas. **Revista do Historiador**, v. 4, n.4 p. 96-116, 2011.

RACKE, K.; SCHWORER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. **Pharmacological Research**, v. 23, p. 13-25, 2000.

RADWAN, M. A. A., et al. Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3832–3841, 2007.

RASOOL, M.; VARALAKSHMI, P. Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on MSU crystal-induced inflammation-an in vivo and in vitro study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 3, p. 174–180, 2006.

REGNER, G. G., GIANESINI, J., VON BOROWSKI, R.G., SILVEIRA, F., SEMEDO, J.G., FERRAZ, AD.B. F., WILLAND, E., VON POSER, G., ALLGAYER, M., PICADA, J.N., PEREIRA, P. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: a medicinal plant with antifungal activity. *Environ. Toxicology Pharmacology*, V.31, 242–249, 2011.

RIBEIRO, R. A., et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 112, n. 1, p. 27-35, 1997.

ROBERTS, R. A., et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, v. 276, p. 85–94, 2010.

ROCHA, S. M.; GARCIA, L. J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: International series of Monographs in Pure and Applied Biology, **Modern Trends in Physiological Sciences**, v. 37, p. 1 – 47, 2006.

ROCKS, S. A., et al., Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry, **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, n. 7, p. 937–948, 2005.

ROCK,, K. L.; LATZ E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The Sterile Inflammatory Response. **Annual Reviews Immunology**, v. 28, p. 321–42, 2010.

ROGLER, G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p.157–165, 2010.

ROMITELLI, F.; et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography**, v. 851, p. 257-267, 2007.

STOLC, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sciences**, v.65, n.18/19, p.1943-1950, 1999.

SALEH, M., The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death, **Nature Reviews Immunology**, v 243, p.235–246, 2011.

SALVEMINI, D., et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 951–966, 2011.

SAMUELSSON, B. Role of basic science in the development of new medicines:examples from the eicosanoid field, **Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.10070–10080, 2012.

SANTER, V.; SRIRATANA, A. e LOWTHER, D.A.Carrageenin-induced arthritis: morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Semin. Arthritis Rheumatology**. V.13, p.160-168, 1983.

SAYAR, K.; MELLI, M. Effect of combination of misoprostol and indomethacin on eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, p. 365-371, 1999.

SCALCO, N., et al. Literatura antiga (Século XVIII e XIX) com relatos de plantas medicinais nativas encontradas em instituições de quatro cidades brasileiras. In: **Aspectos históricos na pesquisa etnobiológica**. NUPEEA, 2010.

SCATENA, R., et al. An update of pharmacological approaches to neurodegenerative diseases. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, p. 59–72, 2007.

SCHAFER-KORTING, M., et al. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action **Skin Pharmacology Physiology**, v.18 p.103–114, 2005.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. R. Function in redox signaling and oxidative stress. **Current. Biology**, v.24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v. 8, p. 93–15, 2006.

SEPIASHVILI, R. I.; BALMASOVA, I. P.; STAURINA, L. N. Serotonin and its immune and physiological effects. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**. v. 99, n.1, p.17-32, 2013.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHANG, J. H., et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects. **Journal Ethnopharmacology**, v. 129, p. 174-181, 2010.

SHARON, B.; ELIZABETH, A. *A Wound Care Essentials: Practice Principles*. **Lippincott Williams e Wilkins**, p 91-93, 2003.

SHAHIDI, F. ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity, **Journal of Functional Foods**, v.18, p.757-781, 2015.

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

SHEN, H. W, JIANG X.L, WINTER JC, YU A,M. Psychedelic 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine: metabolism, pharmacokinetics, drug interactions, and pharmacological actions. **Current Drug Metabolism**. v.11, p. 659-666, 2010.

SHIN DI, B. U. Interleukin 10 inhibits TNF-alpha production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 beta. **Immunological Investigations**, v. 28, p. 165–75 1999.

SINGH, R, P. SHARMA, S KANT, R. , PRAVEER A. SINGH, SETHI, A. Expedient synthesis of novel pregnane-NSAIDs prodrugs, XRD, stereochemistry of their C-20 derivatives by circular dichroism, conformational analysis, their DFT and TD-DFT studies, **Journal of Molecular Structure**, v. 1105, p. 423-433, 2016.

SILVA, V. G., et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus* Valdele. **Journal of Natural Products**, v. 276, n. 6, p.1071-7, 2013.

SILVA, V. G., et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus* Valdele. **Journal of Natural Products**, v.276, n. 6, p.1071-7, 2013.

SIMMONS, D. L.; BOTTIN, G. R. M.; HLA, T. The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Revs**. v. 56, p. 387-437, 2004.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMISIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular pharmacology**, v. 71, p.40-56, 2015.

SMITH W. H. L; DEWITT, D. L., GARAVITO, R. M: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review Biochemistry**, v. 69, p.145-182, 2000.

SPONCHIADO, G. ADAM, M. L. SILVA, C. D. SOLEY, B S. MELLO-SAMPAYO, C CABRINI, CASSYANO D. A. CORRER, J, OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

SOROKIN, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. **Nature Immunology**, v. 10, p. 217-223, 2010.

SOTTOMAYOR, M. et al. Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**, v.3, p.159-171, 2004.

SOUSA, G.E.P., FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v.17, p.1–5, 1985.

SOUTO, F. O., et al. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: Inhibition of Actin Polymerization. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 113–118, 2011.

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, p.1-6. 2002.

SUZUKI, S., et al. Antiinflammatory effects of polyamines. **Ensho**, v. 34, p. 409-410, 1983.

TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. **Science**, v. 339, n. 1, p. 166-172, 2013.

TALHOUK, R. S., et al. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts **Journal Medical Food**, v.10, p.1-10. 2007.

TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A. A.; HOSSEINI, L. Crocin alleviates the local paw edema induced by histamine in rats **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.2, n. 2, p.97-104, 2012.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus, **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p.456–480, 2015.

TANG, M.L.Y.; HAAS, D.A.; HU, J.W. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. **Anesthesiology** p. v.51, p.2–9, 2004,

TASOULI, A. I., et al. Antioxidant Activity of Novel Indole Derivatives and Protection of the Myocardial Damage in Rabbits. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 2, p. 165—168, 2002.

TONUSSI, C. R., FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**.v. 48. n. 3. p. 421 427. 1992.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal of Pharmacology**, v. 251, p. 173 – 179, 1994.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Tumour necrosis factor- α mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, v. 82, p. 81–87, 1999.

TURNBULL, C. M. M., et al., A novel hybrid aspirin-NO-releasing compound inhibits TNF α release from LPS-activated human monocytes and macrophages, **Journal Inflammation**, v.5, 2008.

UMAR, A., et al. Mechanisms of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) In Cancer Prevention. In: **Seminars in Oncology**, 2015.

VALE, M. L. et al. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **European Journal of Pharmacology**, v. 536, p.309–317, 2006.

VAN W. J. P.; GOOSENS, J. G. Arabinolactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. **Agents Action**, v.28, p. 78-82, 1989.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature. New biology**, v. 43, p. 232-235, 1971.

VANE, J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. **Journal Physiological Pharmacology**, and reference cited therein, v. 51, p. 573-586, 2000.

VEIGA, F., et al. Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, 2005.

VIEIRA, A. C. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Punica granatum* L. (Romã)**. 2014. Dissertação (Mestrado em enfermagem) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, p.711-4, 1973.

WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). In: **Social History of Medicine Advanced Access**. Oxford: Oxford University Press, 2013.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Reviews Cancer*, v.10, p.181–193, 2010.

WANG, X., et al. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies, **Fitoterapia**, v. 86, p. 35-47, 2013.

WENTEN, M., et al. Functional variants in the catalase and myeloperoxidase genes, ambient air pollution, and respiratory-related school absences: an example of epistasis in gene–environment interactions. **American Journal of Epidemiology**, v.170, n. 12, p.1494–1501, 2009.

WILLIAMS, J. E. Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicine Review**, v.6, n.6, p. 567-79, 2001

WHITEHOUSE, M. W, et al. Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvant activity in rats to vehicle composition. **Immunology**, v. 27, n.2, p. 311-30, 1974.

WILLIAMS, P. B. BARNES, C S. PORTNOY, J. M. Innate and Adaptive Immune Response to Fungal Products and Allergens, **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2016.

WILLOUGHBY, D. A. In vivo models of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 109 – 113, 2003.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A; NUSS, G. W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**, v.111, p.544-7, 1962.

WINK, M. Alkaloids: Properties and Determination, In Encyclopedia of Food and Health, **Academic Press**, Oxford, , p.97-105, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/collect/medicine/whozip57e/whozip57e.pdf>. Acesso em: 24/01/2016.

XI-LING, JIANG, HONG-W.U, SHEN, AI-MING Y.U, Modification of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine-induced hyperactivity by monoamine oxidase A inhibitor harmaline in mice and the underlying serotonergic mechanisms. **Pharmacological Reports**. v.68 p.608-615, 2016.

XU-JIE, Q., et al, Indole alkaloids with antibacterial activity from aqueous fraction of *Alstonia scholaris*. **Tetrahedron**, v 71, p. 4372-4378, 2015.

YADAV, U. C. S.; ROMANA, K. V. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

YAMAGUCHI, T.; et al. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 35, p. 77-83, 1999.

YANG, M. F.; CHIEN, C. L.; LU, K. S. Compound 48/80-induced degranulation of GnRH-like immunoreactive mast cells in the brain and mesentery of the gerbil. **Zoological Studies**, v. 41, n. 1, p. 99-110, 2002.

YEN, P.; et al. O efeito protector de pinheiro (*Pinus morrissonicola* Hay.) de agulha sobre a oxidação de LDL e a sua ação anti-inflamatória através da modulação de iNOS e COX-2 na expressão estimuladas com LPS de macrófagos RAW 264.7 **Food Chemical. Toxicology**, v. 46 p. 175-185, 2008.

YU, Y.; et al. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. **Skeletal Radiology**, v. 35, p. 156–164, 2006.

YUAN, G. et al. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, p. 143-152, 2006.

ZHOU, H. Y.; et al. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.

ZOU, J.; BIRD, S. SECOMBES, C. Antiviral sensing in teleost fish. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p. 4185–4193, 2010.