



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA MICHELI MARTINEZ

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *TEPHROSIA SINAPOU* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS**

RENATA MICHELI MARTINEZ

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *TEPHROSIA SINAPOU* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Rúbia Casagrande

Co-Orientador: Prof. Dr. Waldiceu A. Verri Júnior

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M385a Martinez, Renata Micheli.

Atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica do extrato de *Tephrosia sinapou* em modelos experimentais / Renata Micheli Martinez. – Londrina, 2011. 102 f. : il.

Orientador: Rúbia Casagrande.

Co-orientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Tephrosia sinapou* – Teses. 2. Plantas – Uso terapêutico – Teses. 3. Flavonóides – Teses. 4. Antioxidantes – Teses. 5. Inflamação – Teses. 6. Matéria médica vegetal – Teses. 7. Farmacologia experimental – Teses. I. Casagrande, Rúbia. II. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 615.89

RENATA MICHELI MARTINEZ

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANALGÉSICA DO EXTRATO DE *TEPHROSIA SINAPOU* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-
graduação em Ciências da Saúde da Universidade
Estadual de Londrina - UEL.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Rúbia Casagrande
Orientadora
UEL –Londrina - PR

Prof. Dr Décio Sabbatini Barbosa
Componente da Banca
UEL –Londrina - PR

Wander Rogério Pavanelli
Prof. Dr., Componente da Banca
UEL –Londrina - PR

Estefânia Gastaldello Moreira
Prof. Dra., Suplente da Banca
UEL –Londrina - PR

Ciomar A. Bersani Amado
Prof. Dra., Suplente da Banca
UEM - Maringá - PR

Londrina, ____ de _____ de 2011.

A DEUS QUE ME ILUMINOU E ME DEU
FORÇAS PARA CHEGAR ATÉ AQUI.

Aos meus pais Josefa e Roberto que sempre
me ajudaram e me apoiaram em todos os
momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Rúbia Casagrande, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, e sobretudo pela amizade, compreensão e confiança.

A Prof. Dr. Waldiceu A. Werri Júnior, pela co-orientação e por toda ajuda e apoio prestado.

Aos professores: Dr. Décio Sabbatini Barbosa, Dr. Wander Rogério Pavanelli, Dra. Estefânia Gastaldello Moreira e Dra. Ciomar Bersani Amado, por terem aceitado o convite de participarem da banca examinadora da minha dissertação.

Ao Márcio Giocondo, companheiro nesta trajetória, pela compreensão, apoio e carinho.

A Ana Carla Zarpelon pela ajuda no laboratório, na realização de experimentos, nas discussões científicas e pela amizade.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, em especial àqueles que participaram mais diretamente da minha formação científica.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

A funcionária da Secretaria de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL: Sandra Lage, pela assessoria técnico-científica.

A todos do laboratório de Pesquisa em Dor Neuropatia e Inflamação do Departamento de Patologia da UEL pelo convívio e contribuição para meu crescimento científico e humano.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho ou estiveram ao meu lado nesta jornada.

MARTINEZ, Renata Micheli. **Atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica do extrato de *Tephrosia sinapou* em modelos experimentais.** 2011. 102f. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

RESUMO

A espécie *Tephrosia toxicaria*, também conhecida como *T. sinapou* (Buc'hoz) A. Chev é uma fonte de diversas substâncias como flavonóides e compostos químicos novos. No entanto, há poucos estudos sobre seus efeitos terapêuticos. Há evidências que flavonóides isolados apresentam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e analgésicos. Assim, foram investigados os mecanismos antioxidantes do extrato acetato de etila (EAE) de *T. sinapou in vitro*, e os efeitos e mecanismos anti-inflamatórios e antinociceptivos desse extrato em camundongos. O extrato apresentou atividade antioxidante e os mecanismos envolvidos foram poder redutor, sequestro de radicais livres carregados negativamente (DPPH[•]) e positivamente (ABTS⁺), quelação de ferro e inibição da lipoperoxidação independente e dependente de ferro. O tratamento dos animais com o extrato de *T. sinapou* reduziu o recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos induzido pela carragenina (Cg), zimosan, lipopolissacarídeo e glicogênio. Estes efeitos anti-inflamatórios do extrato mostraram-se dependentes da redução da produção de citocinas quimiotáticas (TNF α e IL-1 β) e da indução da produção de óxido nítrico, já que foram inibidos pelo tratamento com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase. O extrato também inibiu o comportamento de nocicepção manifesta, e foi ativo via intraperitoneal, via oral e via subcutânea. O tratamento dos animais com o extrato inibiu o comportamento de nocicepção manifesta induzido por ácido acético, fenil-p-benzoquinona, formalina e adjuvante completo de Freund (CFA). Na hiperalgesia mecânica induzida pela Cg, prostaglandina E₂, (pré-tratamento) e CFA (pós-tratamento) o extrato de *T. sinapou* também foi efetivo. Seus mecanismos de atividade antinociceptiva mostraram envolver a redução da produção das citocinas hiperalgésicas TNF α e IL-1 β . Além disso, o extrato aumentou o limiar nociceptivo térmico, sugerindo agir via mecanismos de ação supra-espinhais, incluindo a possibilidade de participação opióide. De fato, o efeito anti-hiperalgésico do extrato na hiperalgesia mecânica e térmica e a redução do recrutamento de neutrófilos induzido pela Cg mostraram-se dependentes de receptores opióides, já que foram prevenidos pelo tratamento com naloxona, um antagonista de receptores opióides. Não houve alteração nos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e na habilidade locomotora dos animais pelo tratamento com o extrato o que descarta efeitos tóxicos e relaxantes musculares/tóxicos ou sedativos que prejudiquem a atividade locomotora, respectivamente. Concluindo, o extrato de *T. sinapou* é uma fonte promissora de compostos terapêuticos e mais estudos são necessários para determinar se um único ou um conjunto de compostos podem mimetizar as atividades terapêuticas e mecanismos de ação do extrato.

Palavras-chave: *Tephrosia sinapou*. Flavonóides. Antioxidantes. Inflamação. Dor.

MARTINEZ, Renata Micheli. **Antioxidant, antiinflammatory and analgesic activities of the *Tephrosia sinapou* extract in experimental models.** 2011. 102f. (Health Science Dissertation) - Londrina State University, Londrina, Parana.

ABSTRACT

Tephrosia toxicaria, which is currently known as *T. sinapou* (Buc'hoz) A. Chev. is a source of compounds such as flavonoids including novel ones. However, few studies have addressed their therapeutics effects. There is evidence of antioxidant, anti-inflammatory and analgesic effects of isolated flavonoids. Therefore, were evaluated the antioxidant mechanisms of the *T. sinapou* ethyl acetate extract (EAE) *in vitro*, and anti-inflammatory and analgesic effects and mechanisms of the extract in mice. The extract presented antioxidant activity and their mechanisms involve reducing power, scavenging negatively (DPPH[•]) and positively (ABTS⁺) charged free radicals, iron chelation and inhibition of iron-independent and iron-dependent lipid peroxidation. The treated mice with *T. sinapou* extract reduced total leukocytes and neutrophil recruitment induced by carrageenin (Cg), zymosan, lipopolysaccharide and glycogen. These anti-inflammatory effects showed depends on inhibition of production of chemotatic cytokines (TNF α and IL-1 β) and induction of nitric oxide production, since were inhibited by treatment with L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor). *T. sinapou* extract also inhibited overt nociception-like behavior and was active via intraperitoneal, subcutaneous and per oral routes. The treated mice with extract inhibited overt nociception-like behavior, induced by acetic acid, phenyl-p-benzoquinone, formalin and complete Freund's adjuvant (CFA). In mechanical hyperalgesia induced by Cg, prostaglandin E₂ (pre-treatment), and CFA (post-treatment), *T. sinapou* extract was also effective. Their mechanisms of antinociceptive activity showed involve the inhibition of hyperalgesic cytokines production, TNF α and IL-1 β . Furthermore, the extract increased the thermal nociceptive threshold, suggesting that it could present supra-spinal effects, possibly opioid-like effects. In fact, the inhibition by the extract of carrageenin-induced mechanical and thermal hyperalgesia and the recruitment of neutrophils showed depends on opioid receptors, since was inhibited by naloxone treatment, an opioid receptor antagonist. There was no alteration in aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) serum levels and locomotor activity of mice by *T. sinapou* extract treatment disproving toxic effects and muscle relaxing/toxics or anesthetic effects that impair the locomotory ability, respectively. Concluding, *T. sinapou* extract are conceivable sources of therapeutic compounds and further investigation is necessary to determined whether single or a mixture of compounds can mimic the extract therapeutics activities and action mechanisms.

Key-words: *Tephrosia sinapou*. Flavonoids. Antioxidant. Inflammation. Pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da planta <i>Tephrosia sinapou</i>	17
Figura 2 - Propagação e inibição da peroxidação lipídica	19
Figura 3 - Atividade sequestradora do radical DPPH• pelo EAE de <i>T. sinapou</i>	46
Figura 4 - Atividade sequestradora do radical ABTS ⁺ pelo EAE de <i>T. sinapou</i>	47
Figura 5 - Atividade inibidora da LPO independente de Fe ²⁺ pelo EAE de <i>T. sinapou</i>	48
Figura 6 - Atividade inibidora da LPO dependente de Fe ²⁺ pelo EAE de <i>T. sinapou</i>	49
Figura 7 - Atividade queladora de Fe ²⁺ pelo EAE de <i>T. sinapou</i>	49
Figura 8 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz de maneira dose-dependente o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg	51
Figura 9 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan, glicogênio e LPS	52
Figura 10 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a produção de citocinas induzida pela Cg.....	53
Figura 11 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz o recrutamento de leucócitos de maneira dependente da óxido nítrico sintase	54
Figure 12 - EAE de <i>T. sinapou</i> inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético e PBQ	55
Figura 13 - EAE de <i>T. sinapou</i> inibe ambas as fases do comportamento de nocicepção manifesta induzido pela formalina	56
Figura 14 - EAE de <i>T. sinapou</i> inibe o comportamento de nocicepção manifesta induzido por CFA.....	57
Figura 15 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg	58
Figura 16 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgesia mecânica induzida por CFA.....	59
Figure 17 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a produção de TNF α e IL-1 β induzida pela Cg.....	60
Figura 18 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE ₂	61
Figura 19 - EAE etila de <i>T. sinapou</i> aumenta o limiar nociceptivo térmico de camundongos no teste da placa quente.....	62
Figura 20 - EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgesia mecânica e térmica e o recrutamento de neutrófilos de maneira dependente de receptores opióides	64
Figura 21 - EAE de <i>T. sinapou</i> não altera os níveis de AST e ALT	65
Figura 22 - EAE de <i>T. sinapou</i> não altera a atividade locomotora	65

Figura 23 - EAE de *T. sinapou* apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica 82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS ⁺	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Ac	Adenilato ciclase
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BPS	Batofenantrolina
CFA	Adjuvante completo de Freund
Cg	Carragenina
CXCL1/KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido tetracético etilenoglicol
ELISA	Enzimaimunoensaio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
Gc	Guanilato ciclase
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido orto fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HO [•]	Radical hidroxil
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
L-NAME	N _ω -Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreto
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NaOH	Hidróxido de sódio
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
ONOO [•]	Peroxinitrito
PBQ	Fenil-p-benzoquinona
PBS	Tampão fosfato salino
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PI ₃ K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
R [•]	Radical lipídico
ROO [•]	Radical peroxil
ROOH	Hidroperóxidos
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TLR	Receptores tipo toll
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina

Tris Hidroximetil aminometano
TRPA1 Receptor de potencial transitório com domínios anquirina 1
v.o. Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS	30
3.1.1	Drogas e Reagentes	30
3.1.2	Material Vegetal	30
3.1.2.1	Preparação do extrato	31
3.1.2.2	Caracterização fitoquímica do extrato	31
3.1.3	Animais	31
3.2	MÉTODOS	32
3.2.1	Avaliação da Atividade Antioxidante	32
3.2.1.1	Determinação do poder redutor	32
3.2.1.2	Determinação da atividade sequestradora do radical livre carregado negativamente, DPPH [•]	32
3.2.1.3	Determinação da atividade sequestradora do radical livre carregado positivamente, ABTS ⁺	33
3.2.1.4	Determinação da atividade inibidora da LPO independente de Fe ²⁺	34
3.2.1.5	Determinação da atividade inibidora da LPO dependente de Fe ²⁺	34
3.2.1.5.1	<i>Isolamento de mitocôndrias de fígados de ratos</i>	35
3.2.1.6	Determinação da atividade queladora de Fe ²⁺	36
3.2.2	Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	36
3.2.2.1	Recrutamento leucocitário	36
3.2.2.1.1	<i>Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal</i>	36
3.2.2.1.2	<i>Recrutamento de neutrófilos para o tecido subcutâneo plantar</i>	37
3.2.2.2	Produção de citocinas	38
3.2.3	Avaliação da Atividade Antinociceptiva	39
3.2.3.1	Teste de contorções abdominais	39

3.2.3.2	Teste de nociceção manifesta induzida por formalina	40
3.2.3.3	Teste de nociceção manifesta induzida por CFA	41
3.2.3.4	Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de pressão crescente na pata.....	41
3.2.3.4.1	<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por Cg</i>	42
3.2.3.4.2	<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por CFA</i>	42
3.2.3.4.3	<i>Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por PGE₂</i>	43
3.2.3.5	Avaliação da hiperalgesia térmica pelo teste da placa quente	43
3.2.4	Avaliação da Toxicidade.....	44
3.2.4.1	Avaliação da toxicidade por análises bioquímicas	44
3.2.4.2	Avaliação do desempenho motor pelo teste de rota-rod.....	44
3.2.5	Análise Estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	46
4.1.1	EAE de <i>T. sinapou</i> Apresenta Poder Redutor.....	46
4.1.2	EAE de <i>T. sinapou</i> Sequestra Radical Livre Carregado Negativamente, DPPH [•]	46
4.1.3	EAE de <i>T. sinapou</i> Sequestra Radical Livre Carregado Positivamente, ABTS ⁺	47
4.1.4	EAE de <i>T. sinapou</i> Inibe a LPO nas Etapas Iniciais.....	48
4.1.5	EAE de <i>T. sinapou</i> Inibe a LPO nas Etapas de Propagação e Terminação	48
4.1.6	EAE de <i>T. sinapou</i> Quela Fe ²⁺	49
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	50
4.2.1	EAE de <i>T. sinapou</i> Reduz o Recrutamento de Leucócitos para a Cavidade Peritoneal de Camundongos	50
4.2.1.1	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz de maneira dose-dependente o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg	50
4.2.1.2	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan, LPS e glicogênio.....	51
4.2.2	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a produção de citocinas induzidas pela Cg na cavidade peritoneal	52
4.2.3	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg de maneira dependente da óxido nítrico sintase.....	53

4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	54
4.3.1	EAE de <i>T. sinapou</i> Inibe o Comportamento de Nocicepção Manifesta em camundongos	54
4.3.1.1	EAE de <i>T. sinapou</i> inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético e PBQ.....	54
4.3.1.2	EAE de <i>T. sinapou</i> inibe ambas as fases do comportamento de nocicepção manifesta induzido pela formalina.....	56
4.3.1.3	EAE de <i>T. sinapou</i> inibe o comportamento de nocicepção manifesta induzido por CFA.....	57
4.3.2	EAE de <i>T. sinapou</i> Reduz a Hiperalgia Mecânica no Teste de Pressão Crescente na Pata	57
4.3.2.1	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgia mecânica induzida pela Cg no pré-tratamento	57
4.3.2.2	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a hiperalgia mecânica induzida por CFA no pós-tratamento.....	58
4.3.3	EAE de <i>T. sinapou</i> Reduz a Produção de Citocinas Induzidas pela Cg no Tecido Subcutâneo Plantar.....	59
4.3.4	EAE de <i>T. sinapou</i> Reduz a Hiperalgia Mecânica Induzida pela PGE ₂	60
4.3.5	EAE de <i>T. sinapou</i> Aumenta o Limiar Nociceptivo Térmico no Teste da Placa Quente	61
4.3.6	EAE de <i>T. sinapou</i> Apresenta Efeitos Anti-hiperalgésicos e Reduz o Recrutamento de Neutrófilos de Maneira Dependente de Receptores Opióides	62
4.3.6.1	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz a Hiperalgia mecânica e térmica induzida pela Cg de maneira dependente de receptores opióides.....	62
4.3.6.2	EAE de <i>T. sinapou</i> reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido subcutâneo plantar induzido pela Cg de maneira dependente de receptores opióides.....	63
4.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	64
4.4.1	EAE de <i>T. sinapou</i> não Altera os Níveis Séricos de AST e ALT.....	64
4.4.2	EAE de <i>T. sinapou</i> não Altera a Atividade Locomotora	65
5	DISCUSSÃO	66
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	66

5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	69
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	73
5.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	79
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Tephrosia* possui aproximadamente 400 espécies distribuídas em regiões quentes de ambos os hemisférios (ALLEN; ALLEN, 1981). Evidências indicam que extratos de plantas obtidos do gênero *Tephrosia* apresentam diversas atividades biológicas. A maioria dos estudos investigou os efeitos de extratos da espécie *Tephrosia purpurea*. Extratos de *T. purpurea* mostraram atividade antiplasmódica *in vitro* (YENESEW et al., 2011), efeitos hepatoprotetores na toxicidade hepática induzida por tioacetamida em ratos (KHATRI; GARG; AGRAWAL, 2009), potencial terapêutico em doenças gastroduodenais, pois apresentou atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* (CHINNIAH et al., 2009), atividade citoprotetora em ratos com úlcera gástrica (DESHPANDE; SHAH; PARMAR, 2003), potencial cicatrizante de ferimentos em ratos (LODHI et al., 2006), inibição da carcinogênese cutânea em camundongos induzida por éster de forbol (SALEEM et al., 2001), da broncoconstrição e da anafilaxia em ratos (DESHPANDE; DAVE; SHAH, 2008). Ainda, extratos de *T. purpurea* reduziram a severidade do status epiléptico induzido por lítio (ASUNTHA et al., 2010), apresentaram potencial antihiperlipidêmico e efeitos antioxidantes em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (PAVANA et al., 2007; PAVANA et al., 2009), efeito quimiopreventivo em ratos contra o estresse oxidativo renal e carcinogênese induzida por N-dietilnitrosamina e bromato de potássio (KHAN et al., 2001). Uma fração flavonóica de *T. purpurea* apresentou propriedades moduladoras dos componentes do sistema imune humoral e celular em camundongos (DAMRE et al., 2003) e o extrato etanólico desta espécie inibiu em ratos a formação do granuloma induzido por pellets de algodão (SHENOY et al., 2010). Flavonóides isolados da espécie *T. purpurea* induziram a atividade da quinona redutase, enzima relacionada à quimioprevenção do câncer (CHANG et al., 1997 e 2000).

Extratos de *T. egregia* e *T. cinerea* mostraram atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (ARRIAGA et al., 2008 e 2009a) e de *T. egregia* mostraram também atividade antioxidante (ARRIAGA et al., 2009a). Extratos de *T. candida* mostraram-se tóxicos e repelentes às fases larvais e adultas do *Diaprepes*, uma praga na agricultura (LAPOINTE; MCKENZIE; HUNTER, 2003), e um flavonóide desta espécie apresentou atividade anticancerígena (SARIN et al., 1976). Extratos de *T. elata* apresentaram atividade antiplasmódica (MUIVA et al., 2009) e de *T. vogelii* atividade ictiotóxica (IBRAHIM et al., 2000). A espécie *T. villosa* é utilizada como planta medicinal para tratamento de diabetes melitus na Índia (JAIN; SHARMA, 1967), extratos desta espécie mostraram atividade antifúngica (VIJAYAN; GURUPRASAD; KIRTI, 2008), larvicida sobre as larvas de *Culex*

quinquefasciatus, e citotóxica frente a larvas de *Artêmia salina*, um microcrustáceo utilizado em testes de toxicidade (NONDO et al., 2011). Compostos isolados de *T. calophylla* (benzil e coumestano derivados) mostraram atividade citotóxica *in vitro* (GANAPATY et al., 2009). Pumilanol, um isoflavonóide de *Tephrosia pumila* apresentou atividade antiprotozoária (GANAPATY et al., 2008).

Desta forma, como evidenciado acima há vários estudos de atividade farmacológica de plantas do gênero *Tephrosia*, apesar de que, poucos relatam atividade antioxidante e anti-inflamatória e nenhum avalia efeitos analgésicos. Diversas evidências indicam a presença de uma variedade de flavonóides e compostos novos em plantas deste gênero (ANDREI et al., 1997, 2000; ARRIAGA et al., 2009b; ARROIO et al., 2004; HEGAZY et al., 2009; JANG et al., 2003).

A espécie *Tephrosia toxicaria* também conhecida como *Tephrosia sinapou* (Buc'hoz) A. Chev. e popularmente conhecida como timbó de caiena (Figura 1), desenvolve-se principalmente no Sri-Lanka (extremidade sul do subcontinente indiano) e América do Sul, e tem despertado interesse por ser uma fonte de rotenóides e muitos outros isoflavonóides (ARROIO et al., 2004; JANG et al., 2003). Esta planta é muito conhecida no norte do Brasil, utilizada para intoxicar peixes, em que os nativos jogam suas raízes na água e assim os peixes podem ser facilmente capturados e consumidos sem inconveniente.

Figura 1 - Foto da planta *Tephrosia sinapou*



Extratos de *T. sinapou* mostraram atividade ictiotóxica (ANDEL, 2000), larvicida contra o *Aedes aegypti* e atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] (VASCONCELOS et al., 2009). Um estudo demonstrou efeitos quimiopreventivos ao câncer de flavonóides isolados de *T. sinapou*, por induzirem em culturas de células a quinona redutase, enzima relacionada à quimioprevenção (JANG et al., 2003).

Extratos de plantas constituem uma complexa mistura de substâncias, e as possíveis atividades biológicas estão diretamente relacionadas com a estrutura e concentração dos constituintes químicos presentes. Resultados preliminares detectaram a presença de flavonóides, incluindo compostos ainda não identificados no extrato acetato de etila (EAE) de *Tephrosia sinapou* (ANDREI et al., manuscrito em preparação). A presença de flavonóides pode atribuir, pelo menos em partes, propriedades farmacológicas ao extrato de *Tephrosia sinapou*, como demonstrado por outras plantas do gênero *Tephrosia* (ARRIAGA et al., 2009b; HEGAZY et al., 2009; KHALIVULLA et al., 2008; REDDY et al., 2009).

O consumo de flavonóides, em alimentos e bebidas, por exemplo, têm sido associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento em diversos estudos clínicos (GELEIJNSE et al., 2002; HERTOOG; HOLLMAN, 1996; HIRVONEN et al., 2001; MUKAMAL et al., 2002; SESSO et al., 1999; YOCHUM et al., 1999), e o consenso que os flavonóides e outros compostos fenólicos, são os responsáveis por estes benefícios é suportado em vários estudos *in vitro* e em animais (BICKFORD et al., 2000; MENG et al., 2010; YUUDIM et al., 2003). Os flavonóides possuem potencial antioxidante *in vitro*, pois são capazes de sequestrar uma ampla variedade de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, tais como o radical superóxido (O_2^{\bullet}), radical hidroxil (HO^{\bullet}), radical peróxil (ROO^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) e o ânion hipoclorito (OCl^{\bullet}). Podem ainda quelar íons metálicos, como o Fe^{2+} , um pró-oxidante, catalisador de reações oxidativas (BOERSMA et al., 1999; CASAGRANDE et al., 2006b; [FRANCESCHELLI](#) et al., 2011; GEORGETTI et al., 2007; HALLIWELL, 2000a, 2008; KETSAWATSAKUL; WHITEMAN; SILVA, 2000; MIRA et al., 2002). Considerando que, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o aumento dos danos oxidativos como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; HALLIWELL, 1999, 2000b, 2002), a utilização de compostos com atividade antioxidante como os flavonóides, ou extrato de plantas contendo estas moléculas torna-se uma alternativa terapêutica promissora.

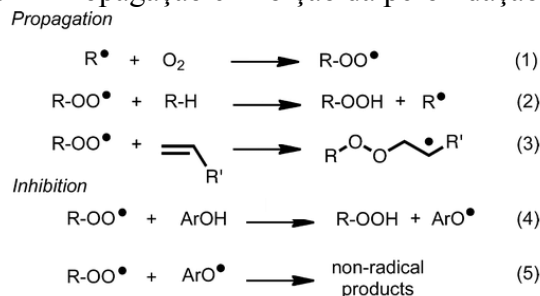
O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) se refere aos radicais livres, moléculas orgânicas ou inorgânicas que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (HALLIWELL, 1999). Há também outras espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) que podem facilmente sofrer reações formando radicais livres. Os radicais livres são produzidos fisiologicamente como, por exemplo, na respiração, ou em algumas células mediadoras da função imune. O excesso de

radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes endógenos ou exógenos, substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de moléculas facilmente oxidáveis, como os lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL, 2007). No entanto, quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano causado pelas EROs nas células pode resultar no estresse oxidativo, que interrompe as funções celulares e em última instância leva a necrose ou morte das células (DRÖGE, 2002; MAGDALENA; TAK YEE 2010).

Moléculas orgânicas insaturadas com fracas ligações C-H são particularmente propensas a sofrerem auto-oxidação, um processo que prossegue por um mecanismo de geração de radicais livres. A auto-oxidação de ésteres e esteróis de ácidos graxos poliinsaturados, conhecida como peroxidação lipídica (LPO), tem atraído a atenção dos pesquisadores, devido ao fato de estar envolvida na geração de diversas EROs (PRATT; TALLMAN; PORTER, 2011).

A LPO se inicia pelo ataque às moléculas orgânicas insaturadas por qualquer espécie suficientemente reativa para retirar um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado. Espécies como o HO^\bullet , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, ROO^\bullet podem realizar essa oxidação (AIKENS; DIX, 1991). Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, leva a uma reação muito rápida (MAILLARD et al., 1983) do radical lipídico formado (R^\bullet) com o oxigênio (Figura 2, equação 1) e uma reação de propagação de velocidade reduzida em que o ROO^\bullet retira um átomo de hidrogênio de um substrato orgânico, conforme mecanismo da Figura 2, equação 2 (HOWARD et al., 1967). Radicais peroxil podem também continuar a propagação da LPO pela reação de adição de alquenos, como representado na Figura 2, equação 3 (HOWARD, 1972). Compostos fenólicos (ArOH , antioxidantes) inibem a auto-oxidação, competem com os radicais peroxil pela transferência de átomos de hidrogênio (Figura 2, equação 4). O radical ariloxil (ArO^\bullet) gerado na transformação descrita na equação 4 se liga a um segundo radical peroxil e origina produtos não radicalares, terminando a LPO (Figura 2, equação 5).

Figura 2 - Propagação e inibição da peroxidação lipídica



Fonte: Pratt, Tallman e Porter (2011).

Antioxidantes, frequentemente os substitutos fenólicos (ArOH), inibem efetivamente os radicais peroxil, pela transferência de átomos de hidrogênio, quando a constante de reação da inibição do radical peroxil (Figura 2, equação 4) é mais rápida que a cadeia de propagação da LPO (BURTON; INGOLD, 1986). No entanto o oposto, com uma elevada concentração de EROs e limitada concentração de antioxidantes pode ocorrer o estresse oxidativo, importante no desenvolvimento de diversas patologias relacionadas com o envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (PRATT; TALLMAN; PORTER, 2011).

Embora não totalmente compreendido, é consenso que há uma relação entre o estresse oxidativo e a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas (BOWIE; O'NEILL, 2000; VALÉRIO et al., 2009a). Uma explicação concebível para essa relação é que na presença de uma elevada concentração de EROs, fatores de transcrição como, por exemplo, o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), são ativados e translocados para dentro do núcleo. O NF- κ B promove então a transcrição de mais citocinas e quimiocinas inflamatórias que fecham uma via de feedback positivo para potencializar a resposta inflamatória, e que pode levar à lesão tecidual pela ativação de fagócitos (BONIZZI; KARIN, 2004; GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). O contrário também parece ocorrer desde que mediadores inflamatórios podem levar à produção de EROs, por exemplo, a citocina TNF α estimula a NADPH oxidase dos macrófagos a produzir O₂[•], e este ainda pode reagir com NO e gerar ONOO[•] (BOUSSETTA et al., 2010; BOWIE; O'NEILL, 2000; VALÉRIO et al., 2009a; VICENTINI et al., 2011). Desta forma, há vias de estimulação recíproca entre os mediadores inflamatórios e os radicais livres, e a interferência destas vias por substâncias antioxidantes como os flavonóides explicam sua atividade anti-inflamatória, além de sugerir a aplicação de flavonóides ou de extratos de plantas contendo flavonóides como agentes anti-inflamatórios (ANDRADE et al., 2010; SANNIGRAHI et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009a; VICENTINI et al., 2011).

Neste contexto, há evidências que os flavonóides inibem a inflamação induzida por radicais livres (CASAGRANDE et al., 2006a), citocinas (MORIKAWA et al., 2003; VALÉRIO et al., 2009a), PGE₂ (MORIKAWA et al., 2003), expressão da óxido nítrico sintase induzível (DIAS et al., 2005) e ativação de NF- κ B (DIAS et al., 2005; VICENTINI et al., 2011). A modulação da produção destas moléculas leva a redução da dor inflamatória (ANJANEYULU; CHOPRA et al., 2003; 2004; FILHO et al., 2008; VALÉRIO et al., 2009a), edema (VALÉRIO et al., 2009a) e recrutamento de leucócitos (SOUTO et al., 2011).

Assim, estes dados suportam os efeitos anti-inflamatórios de flavonóides e outros antioxidantes.

Um importante componente da resposta inflamatória é o recrutamento de leucócitos (exemplo: neutrófilos) para o foco inflamatório, requeridos para fagocitar ou eliminar os agentes infecciosos (FAVACHO et al., 2011; SOUTO et al., 2011; VALÉRIO et al., 2007; VERRI et al., 2007a; 2010). Muitos modelos experimentais são utilizados para estudar o recrutamento de leucócitos ao foco inflamatório. A carragenina (Cg) é um estímulo inflamatório amplamente utilizado para promover a inflamação dependente do aumento de citocinas pró-inflamatórias (CUNHA et al., 2005). Este estímulo é formado por um grupo complexo de polissacarídeos extraído de algumas espécies de algas vermelhas e composto por monômeros relacionados à galactose, sendo de três tipos principais: lambda, kappa e iota, que são capazes de induzir uma resposta inflamatória quando injetados i.p. ou s.c. (MORRIS, 2003).

Outro modelo utilizado para promover o recrutamento de leucócitos, é o zimosan, um polissacarídeo componente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizado como um irritante pró-inflamatório que mimetiza a infecção fúngica (AJUEBOR et al., 1998; [KOLACZKOWSKA et al., 2001](#); 2008; 2009). Estudos demonstraram que o zimosan provoca uma resposta inflamatória por ativar os receptores tipo toll-2 (TLR2) presentes em uma variedade de tecidos e em diferentes tipos de células, principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (GUERRERO et al., 2006; 2008; LI et al., 2010).

Moléculas comumente encontradas na superfície de microorganismos constituem padrões moleculares associados aos patógenos que ativam a resposta imune inata, a primeira linha de defesa contra microorganismos, por meio da interação com os diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores tipo toll (TLR) (MEDZHITOV et al., 1997). Entre os vários RRP, os TLRs se destacam pelo papel central na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. O recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção e o aumento da produção de fatores antimicrobianos devido à ativação de TLRs, ocorre devido à ativação do NF- κ B ([FERREIRA et al., 2011](#); LI et al., 2010). Os TLRs, como TLR1, TLR2 e TLR4 também ativam a NADPH oxidase, e aumentam a produção de EROs nos fagócitos (WEST et al., 2011).

O estímulo inflamatório lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina encontrada na membrana externa de bactérias gram-negativas. Esta endotoxina é reconhecida

pelos TLR4 e ativa a imunidade inata por estimular as células fagocíticas a produzir as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , o que conseqüentemente induz o recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório (ALVES-FILHO et al., 2010; MEDVEDEV, KOPYDLOWSKI, VOGEL, 2000). Um estudo mostrou que a Cg do tipo lambda também ativa a imunidade inata dependente do TLR4 (TSUJI et al., 2003). Ademais, outro estímulo inflamatório comumente utilizado para promover o recrutamento de neutrófilos em análises *in vitro*, é o glicogênio (LIU et al., 2005; RODRICK et al., 1982).

O recrutamento leucocitário inicia-se pelo rolamento seguido da adesão firme dos leucócitos ao endotélio vascular e finalmente a transmigração para o foco inflamatório. O aumento da aderência entre os leucócitos e o endotélio vascular é mediado pela expressão de um conjunto de proteínas de membrana denominadas coletivamente de moléculas de adesão. Dentre as moléculas envolvidas no rolamento de neutrófilos sobre as células endoteliais, destaca-se as selectinas (E e P-selectinas são expressas nas células endoteliais e L-selectina expressa nos leucócitos) e seus respectivos ligantes (carboidratos). A ligação de selectinas aos carboidratos fornece uma interação fraca entre leucócitos e endotélio vascular resultando no rolamento. O rolamento permite a interação e ativação progressiva de selectinas que funcionam como moléculas de adesão e receptores, e quando os respectivos carboidratos as ativam, ocorre a ativação das integrinas. As integrinas interagem com moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, como as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e possivelmente moléculas de adesão vascular (VCAM-1), permitindo a adesão firme dos leucócitos ao endotélio e posterior transmigração. Uma vez aderidos, os neutrófilos ultrapassam a barreira endotelial por aberturas entre as células endoteliais ou por meio destas e se dirigem ao foco de lesão (ZIMMERMAN et al., 1992).

Citocinas são importantes mediadores da inflamação responsáveis pelo recrutamento de leucócitos ao foco inflamatório. Células residentes como macrófagos, mastócitos e fibroblastos quando ativadas por estímulos inflamatórios liberam citocinas, pequenas proteínas responsáveis pelo recrutamento de células às áreas inflamatórias (LEMOS et al., 2009). As citocinas TNF α e IL-1 β são cruciais na inflamação, de maneira que estão envolvidas em todos os tipos de inflamação (LEMOS et al., 2009; VALÉRIO et al., 2007; VERRI et al., 2006a; 2007a; 2008a; 2010; VIEIRA et al., 2009). Sabe-se que, estas citocinas aumentam a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais (TSAI et al., 2011).

O recrutamento de leucócitos é regulado também por outras moléculas, como o óxido nítrico (NO), um gás com múltiplas funções, incluindo a inibição da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais durante condições inflamatórias, e desta

forma, a redução do rolamento, da adesão e da transmigração de leucócitos ao foco inflamatório (TSAO et al., 1996). O NO também induz a interiorização de receptores para mediadores quimiotáticos (PAULA-NETO et al., 2011).

Este gás é biosintetizado pela conversão de L-arginina pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) em óxido nítrico, tendo a L-citrulina como subproduto. São conhecidas três isoformas de NOS, a óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS), a induzida (iNOS), e a eNOS, endotelial (WONG; MARSDEN, 1996). Uma vez sintetizado, o NO pode se difundir para dentro das células vizinhas, onde ele se liga ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel para gerar GMPc (guanosina monofosfato cíclico) a partir de GTP ([guanosina trifosfato](#)). O GMPc ativado se liga a proteínas-alvo incluindo fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfodiesterases, desencadeando cascatas de sinalização celular (ABRAMSON, 2008).

O NO nas células endoteliais é produzido pela expressão da enzima constitutiva eNOS e vários efeitos adversos estão associados com a diminuição de sua disponibilidade (TSAI et al., 2011). Consideráveis evidências indicam que a LDL oxidada induz uma disfunção endotelial associada com uma redução da eNOS e aumento da iNOS (TSAI et al., 2011). No entanto, a relação entre NO e a inflamação celular é complexa, pois enquanto em baixas concentrações é necessário para a homeostasia e tem efeitos protetores, em altas concentrações pode ser citotóxico (TSAI et al., 2011). Altos níveis de NO tem a oportunidade de reagir diretamente com EROs, especialmente $O_2^{\bullet-}$, levando a formação de $ONOO^{\bullet}$, uma molécula tóxica às células endoteliais (TSAI et al., 2011; [EISERICH](#) et al., 1998).

A inflamação excessiva pode causar lesões teciduais dependentes de metaloproteinases e EROs produzidos pelos neutrófilos, como observado em certas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, gota, vasculites, etc. (LEMOS et al., 2009; VERRI et al., 2010). Desta forma, a redução do recrutamento de leucócitos, por exemplo, pela inibição do estresse oxidativo e a consequente redução da produção das citocinas quimiotáticas ou pelo aumento da sinalização do NO no endotélio está associado com benefícios clínicos em diversas doenças inflamatórias.

Os leucócitos no foco inflamatório além de poderem causar lesões teciduais podem também contribuir para o desenvolvimento da dor (CUNHA et al., 2008a). Os neutrófilos produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias, como TNF α que, por sua vez, induz a liberação de outras duas citocinas: IL-1 β e IL-8 (em humanos) ou CXCL1 (em camundongos). A IL-1 β promove a ativação de uma enzima denominada ciclooxigenase responsável pela produção de prostaglandinas (PGs), e a IL-8 ou a CXCL1 promove a

produção local de aminas simpatomiméticas. A CXCL1 assim como o TNF α também induz a liberação IL-1 β , seguida da liberação de prostanoídes (CUNHA et al., 2005; VERRI et al., 2006b; 2007b). As PGs e as aminas simpatomiméticas atuam diretamente nos receptores dos neurônios sensitivos primários induzindo a sensibilização, o que facilita a despolarização por outros mediadores ou estímulos e a possibilidade de hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 2005; FERREIRA; NAKAMURA; ABREU CASTRO, 1978).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou não a uma lesão tecidual (FLÓREZ, 1993). De maneira simplista, há dois tipos de dor: a primeira informa rapidamente que os estímulos do meio ambiente agredem ou colocam em perigo a integridade física do animal, e a segunda informa a presença de alguma disfunção orgânica, ou seja, uma inflamação ou uma neuropatia. A dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios, alguns mediadores apenas sensibilizam a resposta nociceptiva (FERREIRA et al., 2009).

A dor possui um sistema neuronal próprio, denominado sistema nociceptivo. O sistema nociceptivo possui fibras nervosas características distribuídas nos tecidos, as fibras nociceptivas conhecidas como A-delta e C estão associadas à inflamação e são, quando sensibilizadas, capazes de transduzir estímulos mecânicos, térmicos ou químicos em impulsos elétricos, que serão transmitidos ao sistema nervoso central (SNC) (FERREIRA et al., 2009). As fibras sensoriais periféricas se dirigem para o SNC de forma organizada, e o centro metabólico de cada célula neuronal está localizado em seu corpo celular, presente no gânglio da raiz dorsal. De cada gânglio da raiz dorsal sai um prolongamento axônico que se divide em dois troncos, sendo que um deles se dirige para os tecidos periféricos e o outro para a medula espinal – no caso dos nervos espinais – ou para o tronco encefálico – no caso dos nervos cranianos (DEVOR, 1999). Dessa forma, a informação sensorial percorre um longo caminho desde a estimulação periférica, passa pelo gânglio da raiz dorsal e chega à medula espinal, por onde terá acesso aos centros superiores de processamento. As fibras sensoriais entram na medula espinal pelo lado dorsal e fazem sinapse com neurônios secundários em regiões medulares bem definidas, conhecidas como lâminas de Rexed (WILLIS; COGGESHALL, 1991). A ativação dos neurônios subsequentes conduz a informação até o SNC supra-espinal, onde será analisada e interpretada em locais específicos no córtex, lugar em que a dor é finalmente percebida (PRADO, 1999).

O aumento da sensibilidade neuronal é uma característica importante da dor inflamatória, pois é nesse fenômeno que a maioria dos analgésicos anti-inflamatórios atua. A IASP define a sensibilização dos nociceptores em duas categorias: alodinia - resposta dolorosa a um estímulo que antes não era doloroso - e hiperalgisia - resposta dolorosa aumentada a um estímulo previamente doloroso. Um ponto importante em relação à indução da hiperalgisia inflamatória é que a liberação dos mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta imune inata podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos intermediários ou indiretos como as citocinas (exemplos: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-8$) e os mediadores hiperalgésicos finais ou diretos como as PGs e as aminas simpáticas (FERREIRA et al., 2009).

Mediadores finais como a PGE_2 interagem com seus receptores específicos nos neurônios aferentes primários, promovendo modificações moleculares responsáveis pela sensibilização dos nociceptores. A PGE_2 pode atuar por meio da sensibilização de nociceptores que estão normalmente silenciosos durante o processo inflamatório, ou por facilitar a despolarização induzida por outros mediadores químicos, térmicos ou mecânicos. Essa facilitação da despolarização neuronal resulta da ativação dos receptores para PGE_2 acoplados à proteína G, que estimulam a adenilato ciclase (Ac) com consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc/PKA (adenosina monofosfato cíclico/proteína quinase dependente de AMPc), a qual fosforila canais de sódio e de potássio diminuindo o limiar de ativação da célula neuronal, ou seja, causa a sensibilização neuronal (GOLD et al., 1996; 1996b; KHASAR et al., 1998). Todavia, o aumento intracelular de sódio e o fechamento dos canais de potássio induzido pela PGE_2 não é suficiente para a despolarização do neurônio, mas facilita a despolarização induzida por outros mediadores e estímulos. Em suma, mediadores finais causam a sensibilização dos nociceptores e a sua produção está intimamente relacionada com a produção prévia de mediadores intermediários como as citocinas pró-inflamatórias (VERRI et al., 2006b).

Além das citocinas pró-inflamatórias existe a participação de outras moléculas pró-nociceptivas como o peptídeo endotelina (ET-1). A ET-1 medeia a hiperalgisia induzida por citocinas como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-18$, $IL-15$, $IL-12$ e $IL-33$ e a hiperalgisia induzida pela ET-1 depende pelo menos parcialmente da produção de PGE_2 (VERRI et al., 2005, 2006a, 2008b).

Neste contexto, a dor inflamatória pode ser controlada por substâncias que previnem a sensibilização dos nociceptores, por inibirem a produção ou ação de mediadores

hiperalgésicos intermediários ou finais, ou por substâncias que bloqueiam a sensibilização dos nociceptores já instalada, como os opióides e a dipirona (FERREIRA et al., 2009).

Drogas que atuam diretamente, bloqueando a sensibilização dos nociceptores já instalada como a morfina e a dipirona, aumentam os níveis intracelulares de NO, produzido pela ativação da enzima nNOS, o qual ativa a enzima guanilato ciclase (Gc) com consequente produção de GMP. O AMPc está envolvido na gênese da hiperalgesia inflamatória, enquanto o aumento de GMPc induz efeitos opostos aos do AMPc. Assim, a ativação da via L-arginina/NO/GMPc modula a atividade de canais iônicos, restabelecendo a excitabilidade neuronal normal (AGUIRRE-BAÑUELOS; GRANADOS-SOTO, 1999; DUARTE; FERREIRA, 1992; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). Evidências indicam que a administração de doadores de NO reduzem a hiperalgesia induzida por mediadores que sensibilizam diretamente os nociceptores, como a PGE₂ (KEEBLE; MOORE, 2002; BOLLA et al., 2006).

A ativação da via L-arginina/NO/GMPc contrapõe a sensibilização dos nociceptores, por promover a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (K⁺ATP) o que permite a saída deste íon da célula neuronal, equilibra o aumento do potencial de membrana, evita a despolarização, ou seja, reduz a hiperalgesia. A abertura desses canais de potássio ocorre via fosforilação da proteína quinase dependente de GMPc, PKG, a qual é ativada pelo GMPc (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). Estes resultados são corroborados por achados eletrofisiológicos em neurônios nociceptivos primários, onde se demonstrou que a modulação de canais K⁺ATP pelo GMPc reduz a sensibilização neuronal induzida pela PGE₂ (CHI; JIANG; NICOL, 2007). Outros estudos, indicam que a ativação da via L-arginina/NO/GMPc pode também reduzir a dor por meio da liberação endógena de NO na vasculatura nervosa, corrigindo indiretamente o potencial de membrana do nervo e a geração de impulsos pelo aumento do fluxo sanguíneo e do aporte de oxigênio e nutrientes às células nervosas (HANCOCK; RIEGGER-KRUGH, 2008).

Os opióides reduzem a hiperalgesia por dois mecanismos: inibição da adenilato ciclase (Ac), e desta forma, neutralizam a hiperalgesia induzida pela PGE₂, e periféricamente pela ativação da via PI₃Kγ/AKT/nNOS/NO/PKG/K_{ATP} (CUNHA et al., 2010a). Esta via periférica da morfina se inicia pela ação direta nos neurônios nociceptivos primários, pela ativação dos mediadores PI₃Kγ/ proteína quinase B (AKT), e consequentemente a ativação da enzima nNOS e produção de NO, que induz a abertura dos canais K⁺ATP, e reverte a sensibilização dos neurônios nociceptivos primários devido a

PGE₂. Estes efeitos estão associados com a hiperpolarização dos nociceptores, restauração dos potenciais de membrana e logo, a redução da excitabilidade neuronal (CUNHA et al., 2010a).

Embora estes estudos sugerem o NO como um mediador analgésico, o papel do NO no sistema nociceptivo é controverso. De fato, dependendo do nível das vias nociceptivas (central ou periférica) e da quantidade de NO, este pode ter efeitos anti-hiperalgésico ou hiperalgésico. Por exemplo, na medula espinal, baixas e altas concentrações de NO causam anti-hiperalgesia e hiperalgésia respectivamente (SOUSA; PRADO, 2001).

Flavonóides e outros compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são moléculas complexas, os quais têm sido relatados diversas atividades farmacológicas importantes, tais como inibem o estresse oxidativo, a inflamação e/ou produção de citocinas, a hiperalgésia mecânica e térmica por ativar o sistema opióide endógeno e/ou por inibir a produção de citocinas hiperalgésicas (CASAGRANDE et al., 2006a; DE CAMPOS-BUZZI et al., 2006; FILHO et al., 2008; GEORGETTI et., 2007; HEIDARI et al., 2009; KUPALI et al., 2006; MOHAMAD et al., 2010; NARAYANAN et al., 2007; PEREIRA-DA-SILVA; PAZ-PARENTE, 2002; SANNIGRAHI et al., 2011; SOUTO et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009a; VICENTINI et al., 2011). No entanto, apesar do conhecimento da presença de flavonóides no extrato de *T. sinapou* e dos efeitos e mecanismos de ação dos flavonóides, ainda não há estudos que relatem os mecanismos de atividade antioxidante e evidências de atividade anti-inflamatória e analgésica neste extrato.

A OMS (2000) recomenda o desenvolvimento de pesquisas que visem o aproveitamento do potencial terapêutico da flora nacional, de forma a diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde. Os medicamentos fitoterápicos têm ganhado atenção especial em todo o mundo, e o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, com flora equivalente a mais de 56 mil espécies de plantas catalogadas. Acredita-se que cerca de metade dos medicamentos disponíveis no mercado foram originados direta ou indiretamente de produtos naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Neste contexto, a investigação de produtos naturais torna-se uma importante alternativa para o tratamento de doenças, principalmente em países em desenvolvimento. Assim, considerando o aumento do interesse mundial por produtos de origem natural e a presença no Brasil de uma flora rica em substâncias com potencial utilização na clínica, uma abordagem promissora seria a utilização na terapêutica de extratos de plantas, encontradas no Brasil, ricos em substâncias com potenciais atividades farmacológicas, tal como o extrato de *T. sinapou*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar os mecanismos de ação antioxidante *in vitro* do extrato acetato de etila (EAE) de *T. sinapou* e investigar se o tratamento com o extrato apresenta efeitos anti-inflamatórios e analgésicos em camundongos, bem como os mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar os mecanismos antioxidantes *in vitro* do EAE de *T. sinapou* utilizando metodologias que avaliam: potencial redutor, capacidade sequestradora de radicais livres aniônicos (DPPH[•]) e catiônicos (ABTS⁺), inibição da lipoperoxidação independente e dependente de ferro e atividade queladora de ferro.
- 2- Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *T. sinapou* no recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos induzido pelos estímulos inflamatórios: Cg, zimosan, LPS e glicogênio em camundongos.
- 3- Determinar o papel das citocinas, TNF α e IL-1 β , no tratamento com o extrato de *T. sinapou* utilizando o estímulo inflamatório Cg (via intraperitoneal) em camundongos.
- 4- Determinar o papel da síntese do óxido nítrico frente ao recrutamento de leucócitos no tratamento com o extrato de *T. sinapou* utilizando o estímulo inflamatório Cg, em camundongos.
- 5- Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato de *T. sinapou* no comportamento nociceptivo de contorções abdominais induzido por ácido acético e fenil-p-benzoquinona, e no comportamento de nocicepção manifesta de número de flinches e tempo de lambida induzido pela formalina e CFA (adjuvante completo de Freund) em camundongos.
- 6- Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato de *T. sinapou* na hiperalgesia mecânica induzida por: Cg, prostaglandina E₂ (pré-tratamento) e CFA (pós-tratamento) e nos níveis das citocinas, TNF α e IL-1 β , induzidas pela Cg (via intraplantar), em camundongos.
- 7- Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *T. sinapou* na

nocicepção térmica.

- 8- Investigar se os efeitos do tratamento com o extrato de *T. sinapou* na hiperalgesia mecânica e térmica e no recrutamento de neutrófilos induzido pela Cg em camundongos são dependentes de receptores opióides.
- 9- Determinar se o tratamento com o extrato de *T. sinapou* induz efeitos tóxicos/adversos por meio dos níveis de enzimas hepáticas e se altera o desempenho locomotor em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Drogas e Reagentes

Ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido linoléico, CFA, prostaglandina E₂ (PGE₂), fenil-p-benzoquinona (PBQ), dexametasona, dipirona, tween 80, dimetilsulfóxido (DMSO), hidrocloreto de naloxona, brometo de hexadeciltrimetilamônio, 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), N^ω-Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreto (L-NAME), dihidrocloreto de o-dianisidina, zimosan, tris e Trolox foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Carragenina (Cg) da FMC Corporation (Filadélfia, PA, USA) e LPS da Cayman (Ann Arbor, MI, USA). Batofenantrolina (BPS) e quercetina de 95% pureza da Acros (Pittsburgh, PA, USA). Glicogênio, formalina e ácido acético foram obtidos da Merk (Darmstadt, Alemanha). Sulfato de morfina da Cristália (Itapira, SP, Brasil), indometacina da Prodome Química e Farmacêutica (São Paulo, SP, Brasil) e prednisolona da Ouro fino (Cravinhos, SP, Brasil). Kits de ELISA para determinar TNF α e IL-1 β da eBioscience (San Diego, CA, USA). Tween 20, fosfato de potássio mono e dibásico, acetato de sódio, e sulfato ferroso amoniacal da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). NaOH, citrato de sódio, H₂O₂ e metanol da Biotec (Curitiba, PR, Brasil). H₃PO₄, KOH e FeCl₃.6H₂O da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). KCl e etanol da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil). Propilenoglicol, n-butanol da Nuclear (Diadema, SP, Brasil). Sulfato de potássio de Neon (São Paulo, SP, Brasil). EDTA da CAAL (São Paulo, SP, Brasil). HCl da F. Maia (Cotia, SP, Brasil).

3.1.2 Material Vegetal

A espécie *Tephrosia sinapou* (Buc'hoz) A. Chev., da família Fabaceae, foi cultivada e coletada na fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo, Brasil por S. Myasaka. A identificação foi realizada por A. K. Pastorek em junho de 2005, e o voucher da espécie foi guardado no IAC protegido pelo número de identificação: 17211.

3.1.2.1 Preparação do extrato

O extrato acetato de etila (EAE) de *T. sinapou* foi preparado no Laboratório de Pesquisa de Moléculas Bioativas, Departamento de Química da UEL. Primeiramente, as raízes de *T. sinapou* foram secas em estufa com ar circulante e moídas utilizando-se moíno de facas. O pó obtido (8,9 kg) foi submetido à maceração exaustiva a frio com acetato de etila, durante 10 dias com ciclos de 48 horas. O EAE foi lavado exaustivamente com metanol, e seguido de posterior evaporação em evaporador rotativo (conteúdo final de 58,7 g).

3.1.2.2 Caracterização fitoquímica do extrato

As análises fitoquímicas preliminares do EAE de *T. sinapou* foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Moléculas Bioativas, do Departamento de Química da UEL, coordenados pelo professor César Cornélio Andrei. As análises foram realizadas por Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massa e mostraram a presença de flavonóides: 1) um novo biflavonóide nomeado de toxicarina, constituído por unidade de glabrarina e 5-O-metilnitenina; 2) flavanona: 7-O-metilglabranina; 3) rotenóides: tephrosina, rotenolona, deguelina, 6-oxo-6a,12a-dehidrodeguelina, 6a,12a-dehidrorotenona, rotenona e vilosona; 4) flavonols: tephrowatsina A e quercetol B. Outros compostos identificados foram: 1) pterocarpan: flamichapparin B; 2) cumarinas: ácido 2,3-dihidro-p-cumárico. Dois novos compostos foram identificados, um substituto benzaldeído e uma chalcona (ANDREI et al., manuscrito em preparação)

3.1.3 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos Swiss machos adultos pesando de 20 a 25 g, provenientes do biotério central da UEL, e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da UEL pelo menos dois dias antes dos experimentos. Em ambos os biotérios foi utilizado ciclo de claro/escuro (12/12 h), com temperatura ambiente controlada e os animais foram mantidos em gaiolas plásticas claras padrão, com livre acesso a água e ração. Todos os experimentos foram realizados entre 9:00 am e 5:00 pm em salas com temperatura ambiente controlada. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética em experimentação animal da UEL, número do processo 31468.2010.84, e conduzidos de forma a minimizar o número e o sofrimento dos

animais utilizados.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante

3.2.1.1 Determinação do poder redutor

O poder de redução do EAE de *T. sinapou* foi avaliado pelo teste FRAP (poder antioxidante de redução do ferro), segundo Sanchez-Gonzalez et al. (2005). O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ em HCl 40 mM foram adicionados a 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). Esta solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos antes do uso. O EAE de *T. sinapou* foi diluído com DMSO, obtendo-se a concentração de 1,25 mg/mL. Aliquota de 10 µL desta amostra foi adicionada a 900 µL do reagente FRAP preparado previamente, e 90 µL de água deionizada. Foi obtida, no meio reacional, a concentração de 12,5 µg/mL do extrato de *T. sinapou*. O aumento da absorvância foi mensurado após 30 minutos de incubação a 37 °C em 595 nm. O branco foi constituído de 900 µL do reagente FRAP e 100 µL de água deionizada. Para comparação do poder redutor do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 10 µL de amostras de Trolox (0,4 - 2 mmol/L), a forma hidrossolúvel da vitamina E, diluído com auxílio de etanol. As concentrações de Trolox obtidas no meio reacional, e utilizadas para curva de calibração foram de 4-20 µmol/L. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O resultado foi expresso como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox em: µmol/L de Trolox/ µg/mL de extrato.

3.2.1.2 Determinação da atividade sequestradora do radical livre carregado negativamente, DPPH•

A atividade sequestradora do radical estável DPPH• foi determinada pelo decaimento da absorvância mensurado em 517 nm (BLOIS, 1958; CASAGRANDE et al., 2007). O EAE de *T. sinapou* foi diluído com auxílio de DMSO e depois em solução de etanol/propilenoglicol (50:50, v/v), obtendo-se concentrações entre 1,25 - 40 mg/mL do extrato. Aliquotas de 50 µL destas amostras do extrato foram adicionadas ao meio reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução

etanólica de DPPH• 250 µM. Obteve-se no meio reacional concentrações entre 25 - 800 µg/mL do extrato. A mudança na absorvância foi medida após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente em 517 nm. O controle positivo foi preparado com 50 µL do veículo utilizado para diluir o extrato de *T. sinapou* e o branco constituído de 1 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol. Para controle do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 50 µL de amostras do flavonóide quercetina (5 e 500 µg/mL), diluído com auxílio de propilenoglicol e depois em etanol. As concentrações da quercetina obtidas no meio reacional foram de 0,1 - 10 µg/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A capacidade sequestradora do radical DPPH• foi calculada pela seguinte equação:

Equação I: % atividade = (1- absorvância amostra / absorvância do controle positivo) x 100.

3.2.1.3 Determinação da atividade sequestradora do radical livre carregado positivamente, ABTS⁺

A atividade sequestradora do radical livre ABTS⁺ foi determinada pelo decaimento da absorvância mensurado em 730 nm conforme descrito por Sánchez-Gonzalez et al. (2005). O cátion ABTS⁺ foi produzido reagindo 7 mM de solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar e em temperatura ambiente por no mínimo 16 horas antes do uso. Para a reação, a solução de ABTS⁺ foi diluída com tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até uma absorvância de 0,7 a 730 nm. O EAE de *T. sinapou* foi diluído com DMSO, obtendo-se concentrações entre 0,5 - 10 mg/mL. Aliquotas de 100 µL destas amostras do extrato de *T. sinapou* foram adicionadas a 4 mL da solução ABTS⁺ diluída. Foram obtidas, no meio reacional, concentrações entre 12,5 - 250 µg/mL do extrato de *T. sinapou*. A mudança da absorvância foi mensurada após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente. O controle positivo foi preparado com 10 µL de DMSO em 4 mL da solução ABTS⁺ diluída e o branco constituído de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Para controle do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 10 µL de amostras do flavonóide quercetina (40 - 800 µg/mL), diluído com auxílio de propilenoglicol e depois em etanol. As concentrações da quercetina obtidas no meio reacional foram de 0,1 - 2 µg/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade sequestradora do radical ABTS⁺ foi calculada pela equação I.

3.2.1.4 Determinação da atividade inibidora da LPO independente de Fe²⁺

A atividade inibidora da LPO independente de Fe²⁺ foi determinada pela diminuição da formação de hidroperóxido lipídico, um produto primário da peroxidação lipídica (LINGNERT et al., 1979). O EAE de *T. toxicaria* foi diluído com auxílio de DMSO e depois em solução de etanol/propilenoglicol (50:50, v/v), obtendo-se concentrações entre 0,05 - 16 mg/mL do extrato. Preparou-se a emulsão de ácido linoléico 10 mM, em tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5), com auxílio de tween 20. Em 2 mL desta emulsão foram adicionados 20 µL de amostra do extrato. Foram obtidas, no meio reacional, concentrações entre 0,5 - 160 µg/mL do extrato. A determinação de hidroperóxidos lipídicos foi realizada antes e após a incubação da emulsão, a 37°C por 8 horas. Assim, 0,2 mL da emulsão incubada ou não foram adicionados em 2 mL de metanol e 6 mL de metanol 60% e a absorvância foi determinada por espectrofotometria em 234 nm. O controle positivo foi preparado com 20 µL do veículo [DMSO e etanol/propilenoglicol (50:50, v/v)] e o branco constituído de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,5) com tween 20. Para controle do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 20 µL de amostras de quercetina (4 - 160 µg/mL), diluída com auxílio de propilenoglicol e depois em etanol. As concentrações da quercetina obtidas no meio reacional foram de 0,04 - 1,6 µg/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade inibidora da LPO independente de Fe²⁺ foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Equação II: \% atividade} = 1 - \frac{(\text{absA após incubação} - \text{absA sem incubação})}{(\text{absC após incubação} - \text{absC sem incubação})} \times 100.$$

Onde: absA é a absorvância da amostra e absC é a absorvância do controle positivo.

3.2.1.5 Determinação da atividade inibidora da LPO dependente de Fe²⁺

A atividade inibidora da LPO induzida por Fe²⁺ foi determinada pela diminuição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como por exemplo, o malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978; RODRIGUES et al., 2002; CASAGRANDE et al., 2006b). O EAE de *T. sinapou* foi diluído com auxílio de DMSO e depois em solução de etanol/propilenoglicol (50:50, v/v), obtendo-se concentrações entre 0,05 - 8 mg/mL. Foram adicionados em 1 mL de meio de reação (130 mM de KCl e 10 mM de tris-HCl, pH 7,4), 2 mM de citrato de sódio, 20 µL de amostra do extrato de *T. sinapou*, suspensão de mitocôndria correspondente a 1 mg de

proteína e 50 μM de sulfato ferroso amoniacal. Foram obtidas, no meio reacional, concentrações entre 1-160 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *T. sinapou*. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para determinação das TBARS formadas, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% preparado em 50 mM de NaOH, 0,1 mL de NaOH 10 M e 0,5 mL de H₃PO₄ 20% foram adicionados, e em seguida incubou-se a reação por 20 minutos a 85°C. As TBARS foram extraídas com 2 mL n-butanol, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, e a absorvância do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em 535 nm. O controle positivo foi preparado com 20 μL do veículo utilizado para diluir o extrato e o controle negativo preparado sem o extrato e sem o ferro. O branco foi preparado com a mistura da reação sem mitocôndria. Para controle do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 10 μL de amostras de quercetina (4 - 250 $\mu\text{g/mL}$), diluída com auxílio de propilenoglicol e depois em etanol. As concentrações da quercetina obtidas no meio reacional foram de 0,04 - 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade inibidora da LPO induzida por Fe²⁺ foi calculada pela equação III:

$$\% \text{ atividade} = [1 - \text{absorvância amostra} / (\text{absorvância do controle positivo} - \text{absorvância do controle negativo})] \times 100.$$

3.2.1.5.1 Isolamento de mitocôndrias de fígados de ratos

As mitocôndrias utilizadas nos experimentos foram fornecidas pelo laboratório de bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ratos Wister machos pesando aproximadamente 200 g, provenientes do biotério Central da USP de Ribeirão Preto, foram mortos por deslocamento cervical, o fígado foi removido e colocado no meio de homogeneização (meio I) contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH pH 7,4. O fígado foi homogeneizado em Potter-Elvehjem-Reostato com aproximadamente 40 mL do meio I e a suspensão obtida foi centrifugada a 580 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 10300 g por 10 minutos e o precipitado obtido foi ressuspensionado em 10 mL do meio II contendo 250 mM de sacarose, 0,3 mM de EGTA e 10 mM de HEPES-KOH pH 7,4. Após centrifugação a 3400 g por 15 minutos, o sedimento final contendo as mitocôndrias isoladas, foi suspenso em 1 mL do meio III contendo 250 mM de sacarose e 10 mM de HEPES-KOH pH 7,4 (CAIN; SKILLETER, 1987). O conteúdo de proteína mitocondrial foi determinado pelo método de Biureto (GORNAL; BARDAWILL; DAVID, 1949)

3.2.1.6 Determinação da atividade queladora de Fe^{2+}

A batofenantrolina (BPS) é um forte quelador de Fe^{2+} e forma um complexo colorido quando ligada a este íon. A atividade queladora de Fe^{2+} foi determinada pela diminuição da formação do complexo $Fe_2(BPS)_3$ por meio do decaimento da absorvância mensurado em 530 nm e 700 nm (BOLANM; ULVIK, 1987). O extrato de *T. sinapou* foi diluído com auxílio de DMSO e depois em solução de etanol/propilenoglicol (50:50, v/v), obtendo-se concentrações entre 12,5 - 200 mg/mL do extrato. Em 2 mL de meio de reação (130 mM de KCl e 10 mM de tris-HCl pH 7,4), foram adicionados 50 μ mol/L de sulfato ferroso amoniacal e 20 μ L do EAE de *T. sinapou*. Foram obtidos no meio reacional concentrações entre 0,125 - 2 mg/mL do extrato. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente 0,2 mM de BPS foram adicionados. Em seguida incubou-se novamente por 15 minutos à temperatura ambiente e a absorvância determinada em 530 e 700 nm (CASAGRANDE et al., 2006b). O controle positivo foi preparado com 20 μ L do veículo e o branco constituído do meio de reação e Fe^{2+} . Para controle do extrato de *T. sinapou* utilizou-se 20 μ L de amostras de quercetina (100 - 4000 μ g/mL), diluída com auxílio de propilenoglicol e depois em etanol. As concentrações da quercetina obtidas no meio reacional foram de 1 - 4 μ g/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A atividade queladora de Fe^{2+} foi calculada pela equação I.

3.2.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

3.2.2.1 Recrutamento leucocitário

3.2.2.1.1 Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal

A quantificação da migração de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos foi avaliada segundo Valério et al. (2007). Os animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com o EAE de *T. sinapou* (10-100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo utilizado para diluir o extrato (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) de forma a eliminar a hipótese do veículo interferir na atividade farmacológica, 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, Cg (500 μ g/cavidade, diluída em salina e administrada no volume de 200 μ L por animal). O grupo

controle foi tratado via oral (v.o.) com prednisolona (4 $\mu\text{mol/kg}$ diluído em salina, e administrado no volume de 100 μL por animal) 30 minutos antes da administração de Cg (500 $\mu\text{g/cavidade}$). O controle negativo da inflamação foi a injeção i.p. de salina (200 μL).

Foi avaliado também, em outro experimento se o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) reduz o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por outros estímulos inflamatórios, administrados i.p.: zimosan (100 $\mu\text{g/cavidade}$, diluído em salina e administrado no volume de 200 μL), LPS (100 ng/cavidade, diluído em salina e administrado no volume de 200 μL) e glicogênio (25 mg/cavidade, diluído em salina e administrada no volume de 500 μL). O controle negativo foi à injeção i.p. de salina (200 μL para zimosan e LPS e 500 μL para glicogênio).

Em outro experimento os animais foram tratados via subcutânea (s.c.) com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase (10-100 mg/kg, diluído em salina, administrado no volume de 100 μL por animal) ou salina (100 μL) 30 minutos antes do tratamento i.p. com o extrato de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal). Depois de 30 minutos do tratamento com o extrato ou veículo os animais receberam o estímulo, Cg (500 $\mu\text{g/cavidade}$, diluída em salina e administrada no volume de 200 μL por animal). O controle negativo da inflamação foi à injeção i.p. de salina (200 μL) e a droga controle foi a prednisolona (4 $\mu\text{mol/kg}$, 30 minutos antes da Cg).

Seis horas após a injeção de Cg, zimosan, LPS ou glicogênio, os animais foram terminalmente anestesiados, e os exsudatos peritoniais foram colhidos com a introdução de 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) contendo 1mM de EDTA. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer utilizando solução de Turk e a contagem diferencial foi realizada após coloração pela técnica de Rosenfeld e as células foram diferenciadas em microscópio óptico por meio da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x). Os resultados foram expressos como número de leucócitos totais ou neutrófilos (VALÉRIO et al., 2007).

3.2.2.1.2 Recrutamento de neutrófilos para o tecido subcutâneo plantar

A quantificação da migração de neutrófilos para o tecido subcutâneo plantar foi realizada indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO) baseando-se na técnica

primeiramente descrita por Bradley et al. (1982). Neste experimento os animais receberam inicialmente a injeção s.c. de naloxona, um antagonista de receptor opióide, (0,1-1 mg/kg, diluído em salina, administrado no volume de 100 μ L por animal) ou salina (100 μ L) 1 hora antes do tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal), veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou morfina (5 mg/kg, diluída em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal). Após 30 minutos destes tratamentos os animais receberam a injeção intraplantar (i.pl.) do estímulo, Cg (100 μ g/pata, diluída em salina, administrada no volume de 25 μ L por animal). E 5 horas após a injeção do estímulo, amostras dos tecidos subcutâneos plantares foram coletadas em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e mantidas a - 80 °C até o uso. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do ultra turrax (IKA T10), seguida de centrifugação (2 minutos, 16.100 g) a 4°C. A dosagem da MPO foi realizada por reação colorimétrica cinética, na qual em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota do sobrenadante da amostra (7 μ L). Posteriormente, adicionou-se 200 μ L de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,015% de H₂O₂ e a atividade de MPO foi determinada em 450 nm, realizando-se 3 leituras em 1 minuto. A atividade de MPO das amostras foi comparada com uma curva padrão de neutrófilos, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos/mg de tecido da pata).

3.2.2.2 Produção de citocinas

Os níveis das citocinas hiperalgésicas TNF α e IL-1 β foram determinados conforme previamente descrito por Verri et al. (2007), por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções de uso do fabricante (eBioscience). Para dosagem destas citocinas em amostras peritoneais, os animais receberam tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, Cg (500 μ g/cavidade, diluída em salina e administrada no volume de 200 μ L por animal). No grupo controle negativo da inflamação foi injetado apenas salina (200 μ L). Após 2 horas da injeção da Cg, os animais foram terminalmente anestesiados, e os exsudatos peritoneais foram colhidos pela introdução de 1 mL de PBS contendo 1mM de EDTA, centrifugados (10 minutos, 4830 g, 4 °C) e os sobrenadantes analisados por ELISA.

Para dosagem de citocinas em amostras de tecidos subcutâneos plantares, os

animais receberam tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal), veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou dexametasona (Dexa, 2 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração i.pl. do estímulo inflamatório, Cg (100 µg/pata, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal). O grupo controle negativo recebeu a injeção i.pl. de 25 µL salina. Após 2 horas da injeção da Cg, os animais foram terminalmente anestesiados, e amostras dos tecidos subcutâneos plantares foram coletadas em 1 mL de PBS contendo 1 mM de EDTA, trituradas com auxílio do ultra turrax (IKA T10), centrifugadas (10 minutos, 4830 g, 4 °C) e os sobrenadantes analisados por ELISA.

Resumidamente, placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas e incubadas com os anticorpos anti-TNF α ou anti-IL-1 β , diluídos em PBS durante 15-18 horas a 4 °C. Após esse tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS + 0,1% de Tween 20 e bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com albumina de soro bovino (BSA) a 1%. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 15-18 horas a 4 °C com as amostras e suas respectivas curvas padrão. Posteriormente, as placas foram lavadas novamente e incubadas com o respectivo anticorpo biotilado, por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de avidina-peroxidase foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas, e adicionados 50 µL do substrato dihidroclorato de 1,2 fenilenodiamina diluído em tampão fosfato contendo 0,4 mg/mL de H₂O₂ 30%. Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos como picogramas de TNF- α ou IL-1 β baseado na curva padrão destas citocinas.

3.2.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

3.2.3.1 Teste de contorções abdominais

Os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e fenil-p-benzoquinona (PBQ) foram realizados conforme previamente descrito por Verri et al., (2008a). Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (1-100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes dos estímulos nociceptivos, ácido acético e PBQ. Em outro experimento os

animais foram tratados com o extrato de *T. sinapou* (100 mg/kg) via i.p. (0,1 mL/10 g de peso do animal), v.o. (100 µL por animal) e via s.c. (100 µL por animal) 30 minutos antes da administração de ácido acético. O grupo controle foi tratado via i.p. com indometacina (Indo, 5 mg/kg, diluída em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 40 minutos antes dos estímulos nociceptivos. Decorrido os tempos dos tratamentos foi administrado na cavidade peritoneal dos camundongos ácido acético (0,8% v/v, diluído em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal), PBQ (1890 µg/kg, diluído em salina e 2% de DMSO, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou salina (0,1 mL/10 g de peso do animal), o controle negativo da nocicepção. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de vidro e a intensidade do comportamento nociceptivo quantificada pelo número total de contorções abdominais do animal em um período de 0 a 20 minutos após a injeção dos estímulos. As respostas consistem em uma seqüência de contorções e extensões do abdômen, algumas vezes acompanhada por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal. A intensidade das respostas de contorções abdominais foi expressa como escore cumulativo durante 20 minutos.

3.2.3.2 Teste de nocicepção manifesta induzida por formalina

O teste da formalina foi realizado conforme previamente descrito por Dubuisson e Denis, (1977). Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração i.pl. da formalina (1,5 %, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal). O grupo controle foi tratado com morfina (5 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) i.p., 30 minutos antes da injeção de formalina na pata. O grupo controle negativo da nocicepção manifesta recebeu apenas a injeção i.pl. (25 µL) de salina. Após a injeção da formalina os animais foram colocados individualmente dentro de um cilindro de vidro e o tempo cronometrado durante 30 minutos. O número de sacudidas da pata traseira injetada com a formalina (flitches) e o tempo em segundos que o animal lambeu a pata traseira injetada com a formalina foi quantificado cumulativamente como índice de nocicepção. O teste foi dividido em intervalos de 5 minutos, e claramente demonstrado a presença de duas fases, que são características do método. Os 5 minutos iniciais correspondem à primeira fase, chamada de fase neurogênica, na qual ocorre a ativação direta dos nociceptores locais pela formalina. A segunda fase ocorre entre 15 a 30 minutos, chamada de fase inflamatória, na qual o comportamento observado é resultado da ação de mediadores inflamatórios liberados pelo estímulo.

3.2.3.3 Teste de nocicepção manifesta induzida por CFA

O teste de nocicepção manifesta induzida por CFA foi realizado segundo Valério et al., (2009a). Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração i.pl. de CFA (administrado 10 µL por animal). O grupo controle foi tratado com morfina (5 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) i.p., 30 minutos antes da injeção na pata de CFA. O grupo controle negativo da nocicepção manifesta recebeu apenas a injeção i.pl. (10 µL) de salina. Após a injeção de CFA os animais foram colocados individualmente dentro de um cilindro de vidro e o tempo cronometrado durante 30 minutos. O número de sacudidas da pata traseira injetada com CFA (flinches) e o tempo em segundos que o animal lambeu a pata traseira injetada com CFA foram quantificados cumulativamente por um período total de 30 minutos como índice de nocicepção.

3.2.3.4 Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de pressão crescente na pata

A atividade inibidora da hiperalgesia mecânica pelo tratamento com o extrato foi avaliada pelo teste de pressão crescente em pata de camundongos com o uso de uma versão eletrônica dos filamentos de Von Frey (CUNHA et al., 2004). Em uma sala reservada, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico individuais (12×10×17 cm) localizadas em uma plataforma de arame na forma de rede, 15 - 30 minutos antes de iniciar os testes. O teste consiste em um transdutor de pressão (anestesiômetro eletrônico, IITC Life Science, Woodland Hills, CA) adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata do animal foi realizado por meio de uma ponteira de 0,5 mm² de polipropileno. As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma força linearmente crescente no centro da planta da pata dos camundongos até a produção de uma resposta caracterizada pela retirada e sacudida (flinches) da pata estimulada. Após a retirada da pata, a intensidade da força é automaticamente registrada. O valor adotado como resultado (intensidade de hiperalgesia) foi a média de três mensurações em cada tempo avaliado, sendo os animais desafiados antes e após os tratamentos. Os resultados foram expressos por delta (Δ , limiar de retirada em gramas), calculados pela diferença entre a média das respostas obtidas no tempo zero e a média das respostas nos tempos avaliados após os tratamentos. O limiar de retirada foi de $9,2 \pm 0,5$ g (média \pm EPM; n = 30) antes das injeções dos agentes hiperalgésicos testados: Cg (100

µg/pata, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal), CFA (10 µL/pata, administrado no volume de 10 µL animal) e PGE₂ (100 ng/pata, diluído em salina e administrado no volume de 25 µL animal).

3.2.3.4.1 Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida pela Cg

Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (30-300 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração do estímulo Cg (100 µg/pata, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal). O grupo controle foi tratado com indometacina i.p. (5 mg/kg, diluída em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 40 minutos antes da injeção de Cg e o grupo controle negativo da hiperalgesia recebeu a injeção de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi avaliada 1, 3 e 5 horas, após a injeção de Cg.

Em outro experimento, os animais receberam a injeção s.c. de naloxona (0,1-1 mg/kg, diluída em salina, administrada no volume de 100 µL por animal) ou salina (100 µL) 1 hora antes de serem tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal), veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou morfina (5 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal). Após 30 minutos adicionais, os animais receberam a injeção i.pl. de Cg (100 µg/pata, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal). O grupo controle negativo do estímulo hiperalgésico recebeu apenas a administração de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica neste experimento foi avaliada após 3 e 5 horas da injeção da Cg.

3.2.3.4.2 Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por CFA

Os animais receberam injeção i.pl. de CFA (10 µL/pata, administrado no volume de 10 µL/animal) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada 48 horas após, confirmando uma significante hiperalgesia. Após 30 minutos adicionais os animais foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal). O grupo controle foi tratado com indometacina i.p. (5 mg/kg, diluída em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 48,5 horas após a injeção de CFA e o grupo controle negativo recebeu apenas a injeção de salina (10 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi mensurada 48 - 72 horas após a injeção de CFA.

3.2.3.4.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂

Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal), veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou dipirona (metamizol, 80 mg/kg, diluída em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) 30 minutos antes da administração do estímulo, PGE₂ (100 ng/pata, diluído em salina e administrado no volume de 25 µL animal). O grupo controle negativo recebeu a administração de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi avaliada 1, 3 e 5 horas após a injeção do estímulo, PGE₂.

3.2.3.5 Avaliação da nocicepção térmica pelo teste da placa quente

O teste da placa quente foi realizado conforme previamente descrito por [Woolfre e Macdonald \(1944\)](#). Os camundongos foram colocados em um cilindro de vidro de 10 cm de largura sobre uma placa quente (IITC Life Science Inc. Woodland Hills, CA) aquecida à temperatura constante de 52 °C. O tempo normal de latência dos animais na placa quente (tempo de reação) foi de 15 segundos. O tempo de reação foi registrado quando o animal apresentou alguma resposta característica de retirada da pata, como pular ou lambear a pata. Foi estabelecido um tempo máximo de permanência dos animais na placa quente (cut-off), de 30 segundos para evitar danos teciduais. Primeiramente os animais foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal), EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou morfina (5mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal). Em seguida o tempo de latência dos animais na placa quente foi avaliado 30 minutos, 1, 3 e 5 horas após a administração dos compostos.

Em outro experimento, os animais receberam os mesmos tratamentos descritos acima, exceto que 1 hora antes destes tratamentos foram tratados com naloxona s.c. (0,1-1 mg/kg, diluída em salina, administrada no volume de 100 µL por animal) ou salina (s.c., 100 µL). E 30 minutos após a injeção do veículo, extrato de *T. sinapou* ou morfina, os animais receberam a injeção i.pl. de Cg (100 µg/pata, diluída em salina e administrada no volume de 25 µL por animal). O grupo controle negativo recebeu apenas a administração de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia térmica foi avaliada antes e após 3 e 5 horas da injeção do estímulo, Cg. Neste experimento os resultados foram expressos por delta (Δ , limiar térmico de retirada da pata em segundos), calculados pela diferença dos tempos de latência obtidos no tempo zero e os tempos de latência nos tempos avaliados após os

tratamentos.

3.2.4 Avaliação da Toxicidade

3.2.4.1 Avaliação da toxicidade por análises bioquímicas

As atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) também conhecida como transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP) no soro sanguíneo dos camundongos foram determinadas utilizando kits comerciais (Labtest - Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) de acordo com as instruções de uso do fabricante. Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (30-100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) e 5,5 horas após estes tratamentos as atividades séricas de AST e ALT foram determinadas. Este tempo corresponde a 30 minutos de pré-tratamento mais 5 horas após a injeção de Cg e PGE₂. O grupo controle negativo recebeu apenas a administração de salina (0,1 mL/10 g de peso do animal).

3.2.4.2 Avaliação do desempenho motor pelo teste de rota-rod

Com o objetivo de descartar possíveis efeitos: relaxantes musculares ou efeitos tóxicos/sedativos que prejudiquem a atividade locomotora após o tratamento com o EAE de *T. sinapou*, foi avaliado o desempenho motor dos animais utilizando o teste de rota-rod (VALÉRIO et al., 2007). Drogas relaxantes musculares, tóxicas ou sedativas podem alterar o desempenho motor e interferir na resposta dos testes antinociceptivos que dependem da movimentação do animal. Neste teste, o aparato consiste de uma barra com um diâmetro de 2,5 cm, subdividida em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro (Ugo Basile, Model 7600), a qual gira a uma constante rotação de 22 voltas por minuto, e os animais devem permanecer nesta barra durante 120 segundos. Assim, os animais utilizados foram submetidos a treinamento no aparelho 24 horas antes do teste, de forma a eliminar aqueles que não conseguem permanecer na barra por dois períodos consecutivos de 120 segundos. No teste os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg, 0,1 mL/10 g de peso do animal) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, 0,1 mL/10 g de peso do animal) e o desempenho motor foi avaliado após 1,5, 3,5 e 5,5 horas. Estes tempos foram determinados

devido à avaliação da hiperalgesia mecânica ter sido realizada 1, 3 e 5 horas após a injeção dos estímulos (Cg, e PGE₂) e mais os 30 minutos que correspondem ao pré-tratamento com o extrato. O cutt-off utilizado foi de 120 segundos.

3.2.5 Análise Estatística

As concentrações *in vitro* do EAE de *T. sinapou* e da quercetina necessárias para inibir o processo oxidativo em 50% (IC₅₀) foram determinadas pelo software GraphPad Prism®, version 3.02, utilizando uma curva hiperbólica. Os resultados *in vitro* foram apresentados pela média ± EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e foram representativos de 3 experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram analisados estatisticamente com auxílio do software GraphPad Prism®, version 3.02, apresentados pela média ± EPM de mensurações feitas com 5 ou 6 animais em cada grupo, e foram representativos de 2 experimentos separados. As diferenças entre as respostas dos grupos experimentais foram avaliadas por ANOVA com um fator seguido do pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores correspondentes a $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.1.1 EAE de *T. sinapou* Apresenta Poder Redutor

O EAE de *T. sinapou* apresentou ação antioxidante como doador de hidrogênio e assim pode terminar processos oxidativos, convertendo radicais livres em formas estáveis. A solução de 12,5 µg/mL do EAE de *T. sinapou* reduziu o complexo Fe²⁺/TPTZ de forma equivalente a 4 µmol/L de Trolox, ou seja, 0,32 µmol/L de Trolox / µg/mL de extrato.

4.1.2 EAE de *T. sinapou* Sequestra Radical Livre Carregado Negativamente, DPPH[•]

O EAE de *T. sinapou* sequestrou de maneira concentração dependente o radical livre carregado negativamente, DPPH[•] (Figura 3). A linearidade apresentou-se entre 0,025 - 0,2 mg/mL, com IC₅₀ de 142 µg/mL. O platô de atividade foi alcançado com 0,4 mg/mL do extrato com 75% de atividade (Figura 3). O controle quercetina apresentou IC₅₀ de 1,17 µg/mL frente ao radical DPPH[•] (Tabela 1).

Figura 3 - Atividade sequestradora do radical DPPH[•] pelo EAE de *T. sinapou*. As concentrações utilizadas no meio reacional foram de 0,02 - 0,8 mg/L do extrato de *T. sinapou*. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os resultados são representados pela média ± EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.

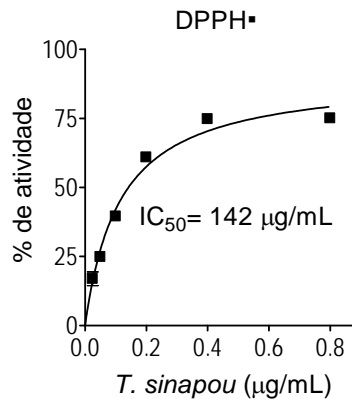


Tabela 1 - Concentrações de quercetina necessárias para inibir o processo oxidativo *in vitro* em 50% (IC₅₀) em diferentes metodologias antioxidantes.

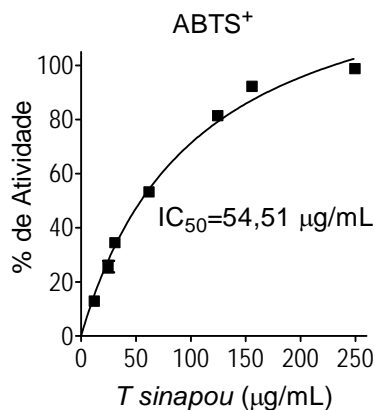
Metodologias	Quercetina - IC ₅₀
DPPH•	1,17 µg/mL
ABTS ⁺	0,82 µg/mL
LPO/Ácido linoléico (Peroxidação lipídica independente de ferro)	0,51 µg/mL
LPO/Fe ²⁺ (Peroxidação lipídica dependente de ferro)	0,34 µg/mL
Batofenantrolina (Atividade queladora de ferro)	4,00 µg/mL

Os resultados são apresentados pela média ± EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.

4.1.3 EAE de *T. sinapou* Sequestra Radical Livre Carregado Positivamente, ABTS⁺

O EAE de *T. sinapou* também sequestrou de maneira concentração dependente o radical livre carregado positivamente, ABTS⁺ (Figura 4). A linearidade apresentou-se entre 25 - 150 µg/mL, com IC₅₀ de 54,51 µg/mL. O extrato de *T. sinapou* sequestrou 99% do radical ABTS⁺ formado (Figura 4), atingindo o platô com a concentração de 250 µg/mL. O controle quercetina apresentou um IC₅₀ de 0,83 µg/mL frente ao radical ABTS⁺ (Tabela 1).

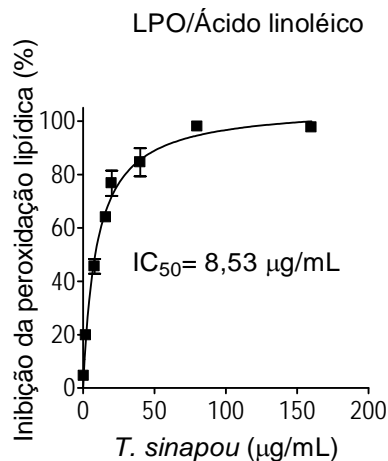
Figura 4 - Atividade sequestradora do radical ABTS⁺ pelo EAE de *T. sinapou*. As concentrações usadas no meio reacional foram de 12,5 - 250 µg/mL do extrato de *T. sinapou*. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os resultados são representados pela média ± EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.



4.1.4 EAE de *T. sinapou* Inibe a LPO nas Etapas Iniciais

O EAE de *T. sinapou* inibiu de maneira concentração dependente a LPO no ensaio utilizando ácido linoléico, ou seja, inibiu a formação de hidroperóxido lipídico, um produto primário da LPO (Figura 5). A linearidade apresentou-se entre 2 - 20 $\mu\text{g/mL}$, com IC_{50} de 8,53 $\mu\text{g/mL}$. O platô de atividade foi alcançado com 160 $\mu\text{g/mL}$ do extrato com 97% de atividade antilipoperoxidativa independente de Fe^{2+} (Figura 5). O controle quercetina apresentou um IC_{50} de 0,51 $\mu\text{g/mL}$ nesta metodologia (Tabela 1).

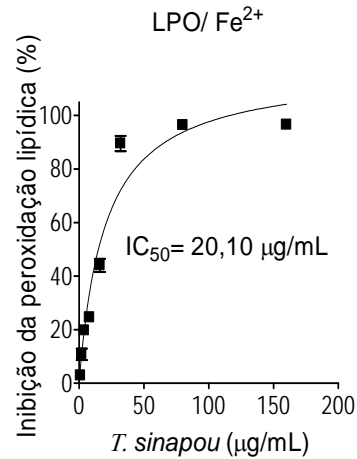
Figura 5 - Atividade inibidora da LPO independente de Fe^{2+} pelo EAE de *T. sinapou*. As concentrações usadas no meio reacional foram de 0,5 - 160 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *T. sinapou*. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os resultados são representados pela média \pm EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.



4.1.5 EAE de *T. sinapou* Inibe a LPO nas Etapas de Propagação e Terminação

O EAE de *T. sinapou* inibiu de maneira concentração dependente a LPO dependente de Fe^{2+} , ou seja, inibiu a formação de TBARS, como por exemplo, o MDA, um dos produtos secundários da LPO (Figura 6). A linearidade apresentou-se entre 2 - 32 $\mu\text{g/mL}$, com IC_{50} de 20,10 $\mu\text{g/mL}$. A atividade máxima (97%) de inibição da formação de TBARS foi obtida utilizando a concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *T. sinapou* (Figura 6). O controle quercetina apresentou um IC_{50} de 0,34 $\mu\text{g/mL}$ frente à LPO induzida por Fe^{2+} (Tabela 1).

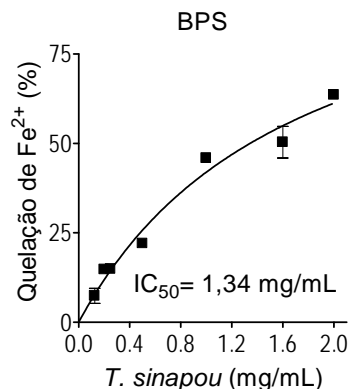
Figura 6 - Atividade inibidora da LPO dependente de Fe^{2+} pelo EAE de *T. sinapou*. As concentrações usadas no meio reacional foram de 1 - 160 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *T. sinapou*. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os resultados são representados pela média \pm EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.



4.1.6 EAE de *T. sinapou* Quela Fe^{2+}

A atividade queladora de Fe^{2+} pelo EAE de *T. sinapou* também foi de maneira concentração dependente (Figura 7). A linearidade apresentou-se entre 0,2 - 1,6 mg/mL , com IC_{50} de 1,34 mg/mL . A atividade máxima (64%) de quelação de Fe^{2+} foi obtida utilizando a concentração de 2 mg/mL do extrato de *T. sinapou* (Figura 7). O controle quercetina apresentou um IC_{50} de 4 $\mu\text{g/mL}$ na quelação de Fe^{2+} (Tabela 1).

Figura 7 - Atividade queladora de Fe^{2+} pelo EAE de *T. sinapou*. As concentrações utilizadas no meio reacional foram de 0,125 - 2 mg/mL do extrato de *T. sinapou*. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os resultados são representados pela média \pm EPM de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e são representativos de 3 experimentos separados.



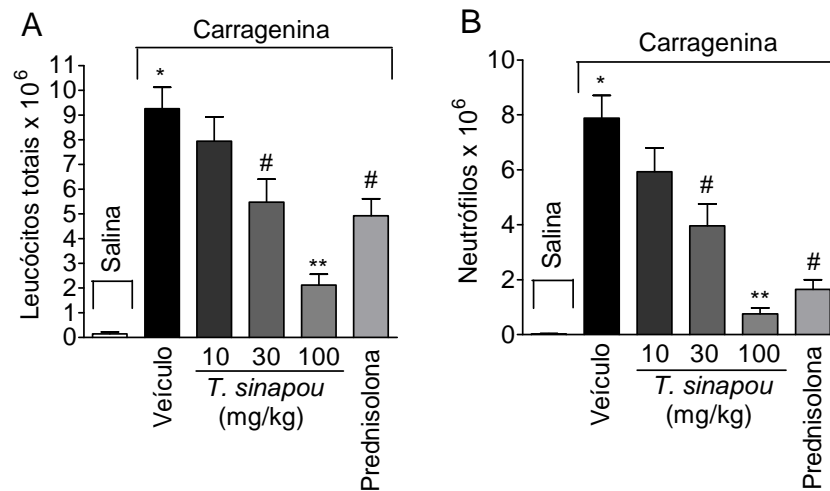
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

4.2.1 EAE de *T. sinapou* Reduz o Recrutamento de Leucócitos para a Cavidade Peritoneal de Camundongos

4.2.1.1 EAE de *T. sinapou* reduz de maneira dose-dependente o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg

Houve um aumento significativo do número de leucócitos totais e de neutrófilos induzido pelo estímulo Cg, que foi reduzido de maneira dose-dependente pelo tratamento com o EAE de *T. sinapou* (Figura 8 A e 8 B respectivamente). A dose de 10 mg/kg do extrato de *T. sinapou* não alterou o recrutamento de células induzido pela Cg. No entanto, a dose de 30 mg/kg do extrato reduziu significativamente o recrutamento de células (leucócitos totais e neutrófilos) induzido pela Cg. A redução do recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos pela dose de 100 mg/kg do extrato foi significativamente maior comparada com a dose de 10 e 30 mg/kg do extrato. Desta forma, a dose de 100 mg/kg do extrato foi selecionada para os próximos experimentos. O grupo tratado com o glicocorticóide prednisolona também reduziu o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos induzido pela Cg (Figura 8 A e 8 B).

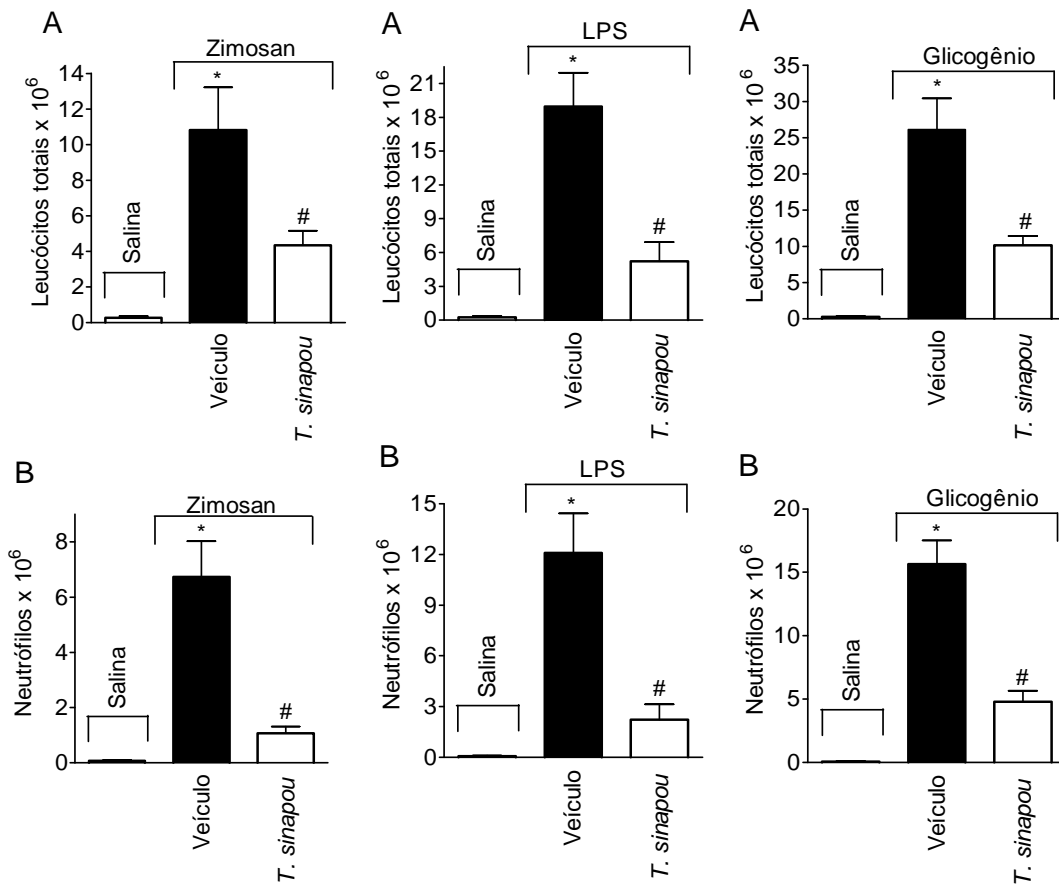
Figura 8 - EAE de *T. sinapou* reduz de maneira dose-dependente o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg. Os camundongos foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina) ou EAE de *T. sinapou* (10-100 mg/kg) 30 minutos antes da administração do estímulo, Cg (500 µg/cavidade). O controle negativo da inflamação foi apenas a injeção de salina (200 µL) e a droga controle foi prednisolona (4 µmol/kg, v.o.) 30 minutos antes da Cg. O número de leucócitos totais (Painel A) e de neutrófilos (Painel B) foi determinado 6 horas após a injeção do estímulo. Barras representam média ± EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg, e ** $P < 0,05$ comparado com as doses de 10 e 30 mg/kg do extrato.



4.2.1.2 EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan, LPS e glicogênio

Os outros estímulos inflamatórios utilizados: zimosan, LPS e glicogênio, também induziram um aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais (Figura 9 A) e de neutrófilos (Figura 9 B) na cavidade peritoneal dos camundongos, o qual foi reduzido pelo tratamento com o EAE de *T. sinapou* (Figura 9 A e 9 B).

Figura 9 - EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan, LPS e glicogênio. Os camundongos foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina) ou EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) 30 minutos antes da administração dos estímulos, zimosan (100 µg/cavidade), LPS (100 ng/cavidade) e glicogênio (25 mg/cavidade). O controle negativo da inflamação foi a injeção de salina (200 µL para zimosan e LPS e 500 µL para glicogênio). O número de leucócitos totais (Painéis A) e de neutrófilos (Painéis B) foi determinado 6 horas após a injeção dos estímulos. Barras representam média ± EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + estímulos.

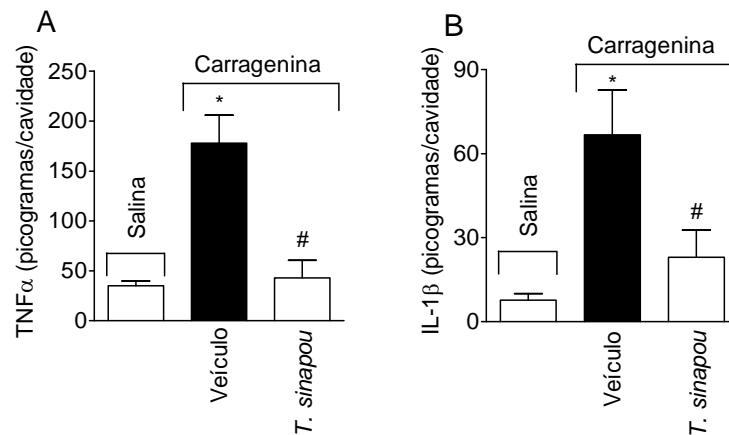


4.2.2 EAE de *T. sinapou* reduz a produção de citocinas induzidas pela Cg na cavidade peritoneal

Após 2 horas da injeção do estímulo Cg houve um aumento significativo na produção de TNF α (Figure 10 A) e IL-1 β (Figure 10 B) na cavidade peritoneal dos camundongos, comparado com o grupo salina. O tratamento com o EAE de *T. sinapou* reduziu significativamente a produção de TNF α (Figure 10 A) e IL-1 β (Figure 10 B). Vale ressaltar que, a produção induzida pela Cg destas citocinas quimiotáticas foi praticamente

abolida pelo tratamento com o extrato de *T. sinapou*.

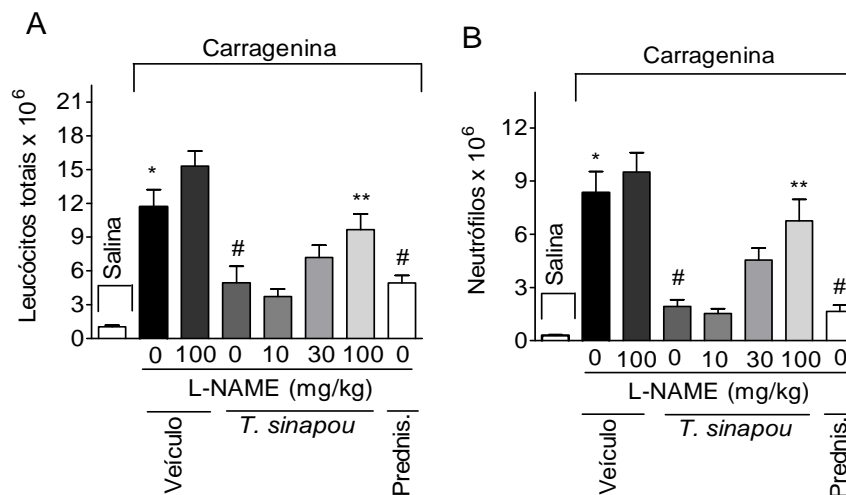
Figura 10 - EAE de *T. sinapou* reduz a produção de citocinas induzida pela Cg. Os camundongos foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina) ou EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) 30 minutos antes da administração do estímulo, Cg (500 µg/cavidade). O controle negativo da inflamação foi a injeção i.p. de salina (200 µL). A produção de citocinas TNF α (Painel A) e IL-1 β (Painel B) foram determinadas 2 horas após a injeção do estímulo por ELISA. Barras representam média \pm EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg.



4.2.3 EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento de leucócitos induzido pela Cg de maneira dependente da óxido nítrico sintase

Novamente o EAE de *T. sinapou* reduziu o recrutamento de leucócitos totais (Figura 11 A) e de neutrófilos (Figura 11 B) induzido pela Cg na cavidade peritoneal dos animais. O tratamento com L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) preveniu de maneira dose-dependente os efeitos anti-inflamatórios de *T. sinapou*, ou seja, preveniu a redução do recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos induzido pela Cg (Figura 11 A e 11 B). As doses de 10 e 30 mg/kg de L-NAME não apresentaram efeitos significativos, mas a dose de 30 mg/kg mostrou uma tendência de prevenção da atividade anti-inflamatória do extrato de *T. sinapou*. A dose de 100 mg/kg de L-NAME preveniu significativamente os efeitos inibitórios de *T. sinapou* no recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos, quando comparado com o grupo controle, extrato de *T. sinapou*, e também quando comparado com o grupo L-NAME 10 mg/kg. O grupo tratado com prednisolona reduziu o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos induzido pela Cg (Figura 11 A e 11 B).

Figura 11 - EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento de leucócitos de maneira dependente da óxido nítrico sintase. Os camundongos foram tratados s.c. com L-NAME (10-100 mg/kg, inibidor da óxido nítrico sintase) ou salina (100 μ L) 30 minutos antes do tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) ou veículo (20% de Tween 80 em salina). Após 30 minutos do tratamento com o extrato ou veículo, os animais receberam i.p. o estímulo Cg (500 μ g/cavidade). O controle negativo da inflamação foi a injeção de salina (200 μ L) e a droga controle foi prednisolona (prednis. 4 μ mol/kg, 30 minutos antes da Cg). O número de leucócitos totais (Painel A) e de neutrófilos (Painel B) foi determinado 6 horas após a injeção do estímulo. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0.05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg, e ** $P < 0,05$ comparado com o grupo extrato de *T. sinapou* e com o grupo da menor dose de L-NAME testada.



4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

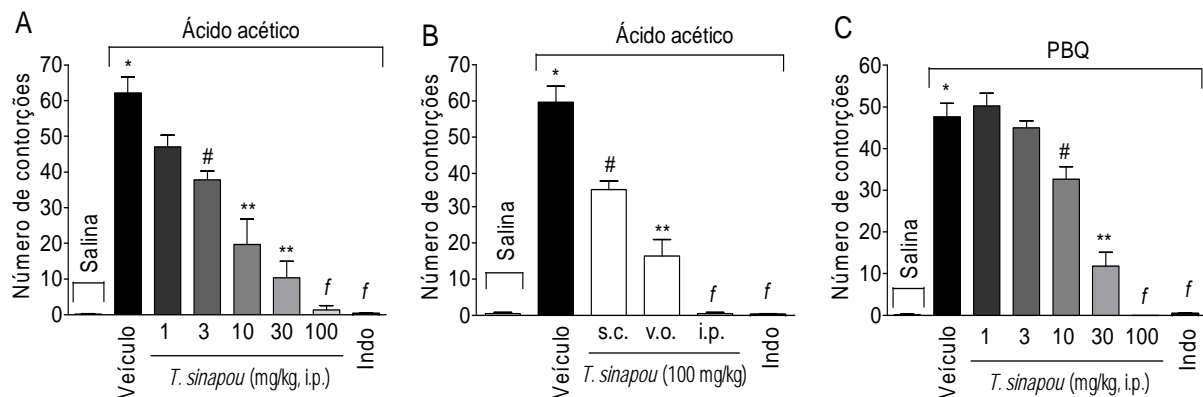
4.3.1 EAE de *T. sinapou* Inibe o Comportamento de Nociceção Manifesta em camundongos

4.3.1.1 EAE de *T. sinapou* inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético e PBQ

Foi observada uma inibição significativa das contorções abdominais induzidas por ácido acético, de maneira dose-dependente, pelo tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* nas doses de 3-100 mg/kg, e esta inibição não foi significativa com a menor dose do extrato, de 1 mg/kg (Figure 12 A). Os efeitos inibitórios das doses de 10 e 30 mg/kg do extrato foram significativamente maiores que os apresentados pela dose de 3 mg/kg, e ainda, a inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético pela dose de 100 mg/kg do extrato foi significativamente maior comparada com a dose de 10 mg/kg (Figure 12 A). Desta forma, a dose de 100 mg/kg do extrato de *T. sinapou* foi escolhida para os próximos

experimentos de nocicepção manifesta. O tratamento com o extrato (100 mg/kg) via i.p., s.c. e v.o. inibiu significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético (Figura 12 B). O EAE de *T. sinapou* foi efetivo também em inibir as contorções abdominais induzidas por outro estímulo, o PBQ, em que foi observada uma inibição significativa das contorções abdominais com doses maiores de 3 mg/kg do extrato, i.p. (Figure 12 C). No modelo com PBQ a inibição das contorções abdominais pelas doses de 30 e 100 mg/kg foi significativamente maior comparada com doses menores do extrato de *T. sinapou*, e ainda a dose de 100 mg/kg do extrato inibiu significativamente as contorções comparada com a dose de 30 mg/kg (Figura 12 C). O tratamento com a indometacina i.p. (5 mg/kg) inibiu significativamente as contorções abdominais em todos estes testes (Figura 12).

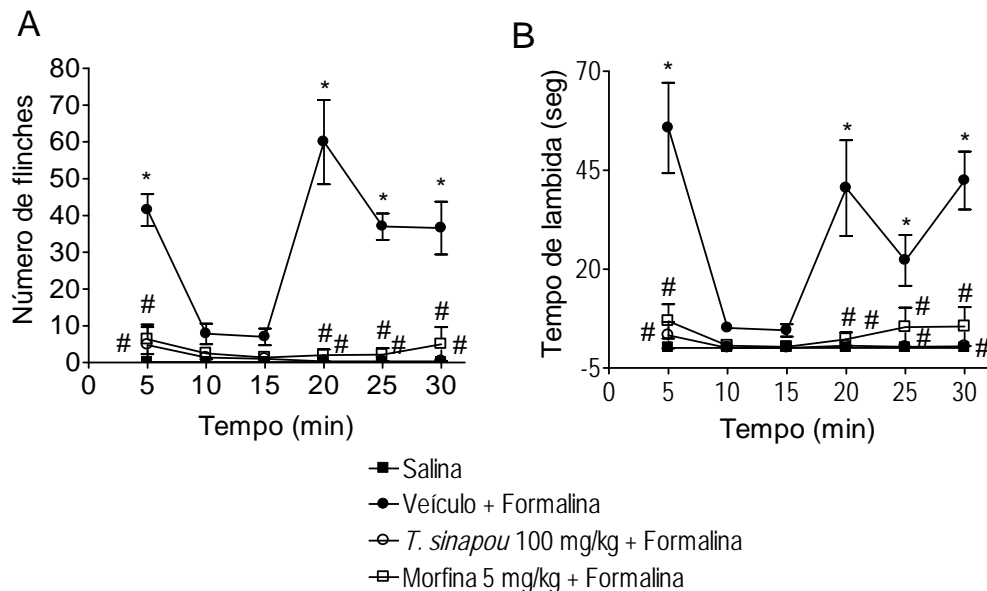
Figure 12 - EAE de *T. sinapou* inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético e PBQ. Painei A: Os animais foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina) ou EAE de *T. sinapou* (1-100 mg/kg) 30 minutos antes da administração do estímulo ácido acético i.p. (0,8%, diluído em salina). Painei B: Os animais foram tratados como em Painei A, porém com 100 mg/kg do extrato de *T. sinapou* i.p., s.c. e v.o. . Painei C: Os animais foram tratados como em Painei A antes do estímulo, PBQ i.p. (1890 µg/kg, diluído em 2% DMSO e salina). O controle negativo da nocicepção foi a injeção i.p. de salina (0,1 mL/10 g de peso do animal), e a droga controle utilizada foi a indometacina (Indo, 5 mg/kg), i.p. e 40 minutos antes da injeção dos estímulos. O número acumulado das contorções abdominais foi avaliado durante 20 minutos após a injeção dos estímulos. Barras representam média ± EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + estímulos, a dose de 1 mg/kg (Painei A) e as doses de 1-3 mg/kg do extrato (Painei C) ** $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo, as doses de 1-3 mg/kg (Painei A) e as doses de 1-10 mg/kg (Painei C) do extrato e a via s.c. (Painei B), e $^f P < 0,05$ comparado com o grupo veículo, as doses de 1-10 mg/kg (Painei A), as doses de 1-30 mg/kg (Painei C) do extrato, e as vias de administração s.c. e v.o. (Painei B).



4.3.1.2 EAE de *T. sinapou* inibe ambas as fases do comportamento de nociceção manifesta induzido pela formalina

O tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) inibiu significativamente o comportamento nociceptivo em ambas as fases, do número de flinches (Figure 13 A) e tempo de lambida (Figure 13 B) na pata injetada com formalina. A inibição do número de flinches e tempo de lambida foram significativos nos tempos 5, 20, 25 e 30 minutos após a injeção da formalina (Figura 13). O tratamento com morfina i.p. (5 mg/kg) também inibiu ambas as fases do teste de formalina (Figura 13).

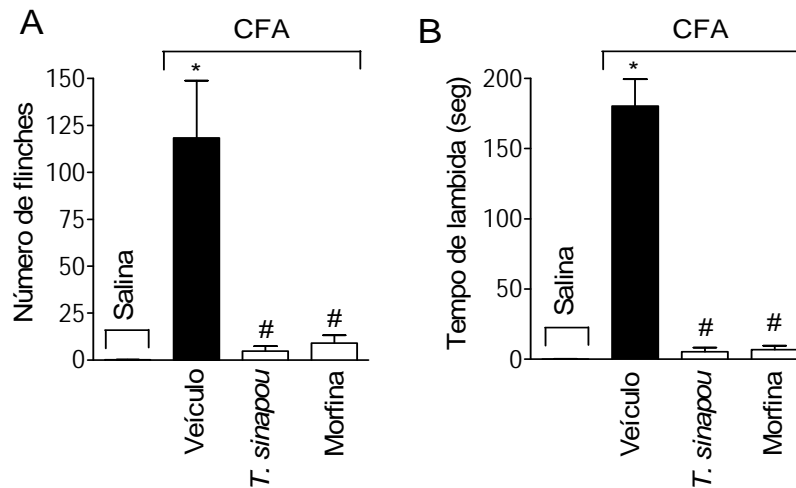
Figura 13 - EAE de *T. sinapou* inibe ambas as fases do comportamento de nociceção manifesta induzido pela formalina. Os animais foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina), EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg) 30 minutos antes da administração do estímulo i.pl., formalina a 1,5%. O controle negativo da nociceção foi a injeção i.pl. de salina (25 μ L). O número total de flinches (Painel A) e o tempo total em segundos que o animal lambeu a pata (Painel B) foram avaliados durante 30 minutos e expressados em intervalos de 5 minutos. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + formalina.



4.3.1.3 EAE de *T. sinapou* inibe o comportamento de nociceção manifesta induzido por CFA

O tratamento i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) também inibiu significativamente o número de flinches (Figure 14 A) e tempo de lambida (Figure 14 B) induzido por CFA. O tratamento i.p. com morfina (5 mg/kg) inibiu o comportamento de nociceção manifesta induzido por CFA (Figura 14).

Figura 14 - EAE de *T. sinapou* inibe o comportamento de nociceção manifesta induzido por CFA. Os animais foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina), EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg), 30 minutos antes da administração i.pl. do estímulo, CFA (10 μ L). O controle negativo recebeu a injeção i.pl. de salina (10 μ L). O número total de flinches (Painel A) e o tempo total em segundos de lambida da pata (Painel B) foram avaliados durante 30 minutos. Barras representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + CFA.



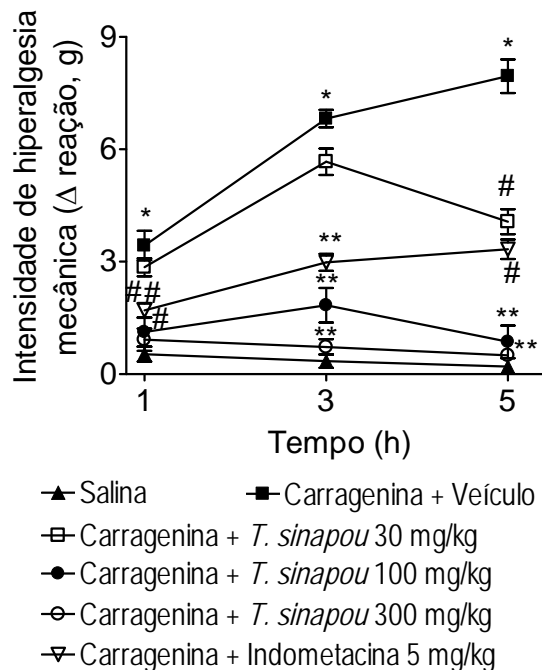
4.3.2 EAE de *T. sinapou* Reduz a Hiperálgia Mecânica no Teste de Pressão Crescente na Pata

4.3.2.1 EAE de *T. sinapou* reduz a hiperálgia mecânica induzida pela Cg no pré-tratamento

A redução da intensidade da hiperálgia mecânica induzida pela Cg pelo tratamento com o extrato de *T. sinapou* foi significativa com a dose de 30 mg/kg somente 5 horas após a injeção da Cg (Figura 15). As doses de 100 e 300 mg/kg do extrato reduziram significativamente a intensidade da hiperálgia mecânica nos tempos 1, 3 e 5 horas quando

comparado com o grupo veículo + Cg, e nos tempos 3 e 5 horas a redução da hiperalgesia mecânica foi também significativa comparada com a menor dose do extrato, de 30 mg/kg (Figura 15). Desta forma, a dose de 100 mg/kg do EAE de *T. sinapou* foi selecionada para os próximos experimentos de hiperalgesia. O tratamento com indometacina (5 mg/kg) i.p., também reduziu a intensidade da mecânica induzida pela Cg (Figura 15).

Figura 15 - EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg. Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (30-300 mg/kg) ou veículo (20% de Tween 80 em salina) 30 minutos antes da administração do estímulo Cg (100 µg/pata). O grupo controle foi tratado com indometacina (5 mg/kg) i.p., 40 minutos antes da injeção de Cg e o grupo controle negativo da hiperalgesia recebeu a administração de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi mensurada 1, 3 e 5 horas, após a injeção de Cg, por um transdutor de pressão eletrônico. Os resultados são representados pela média ± EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg. ** $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg e a dose de 30 mg/kg do extrato.

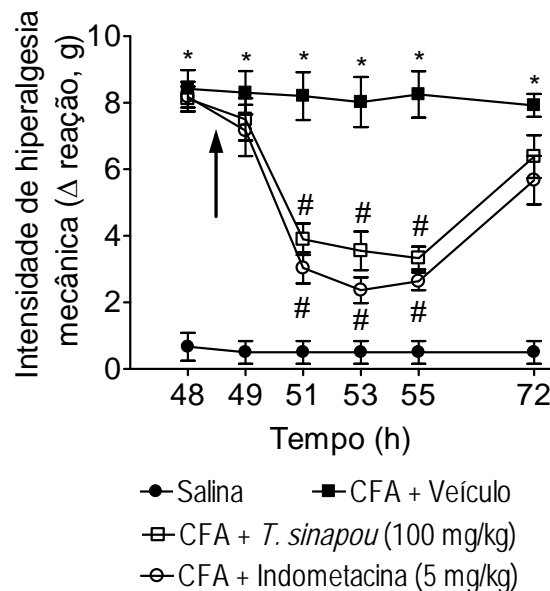


4.3.2.2 EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica induzida por CFA no pós-tratamento

O extrato de *T. sinapou* não alterou significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por CFA 30 minutos após o tratamento, 49 horas após a injeção de CFA (Figura 16). No entanto, o tratamento com o extrato reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por CFA 2,5, 4,5 e 6,5 horas após o tratamento (51, 53 e 55 horas após a

injeção de CFA, respectivamente). O tratamento com indometacina (5 mg/kg) i.p., assim como o extrato de *T. sinapou* reduziu a intensidade da hiperalgesia mecânica induzida por CFA nos tempos indicados (Figura 16).

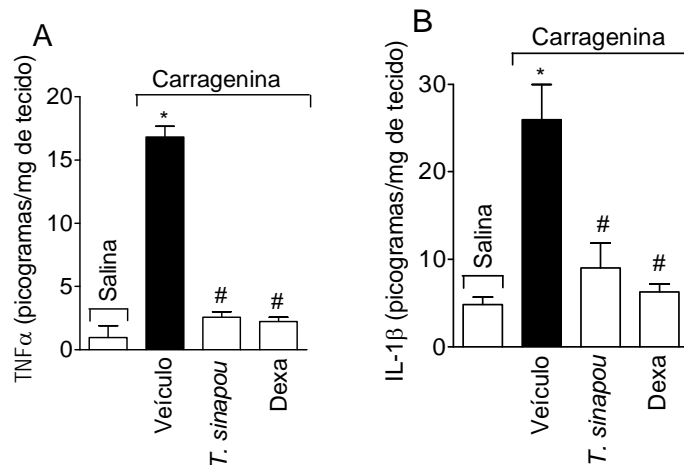
Figura 16 - EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica induzida por CFA. Os animais receberam a injeção i.pl. de CFA (10 µL/pata) ou salina (mesmo volume). Após 48 horas a hiperalgesia mecânica foi determinada, e 48,5 horas após a injeção de CFA os animais foram tratados com o extrato de *T. sinapou* (100 mg/kg, i.p.) indometacina (5 mg/kg, i.p.) ou veículo (20% de Tween 80 em salina, i.p.). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi mensurada 48-72 horas após a injeção de CFA por um transdutor de pressão eletrônico. Os resultados são representados pela média ± EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + CFA.



4.3.3 EAE de *T. sinapou* Reduz a Produção de Citocinas Induzidas pela Cg no Tecido Subcutâneo Plantar

O tratamento com o EAE de *T. sinapou* inibiu significativamente a produção das citocinas hiperalgésicas, TNF α (Figura 17 A) e IL-1 β (Figura 17 B) induzida pela Cg no tecido subcutâneo plantar dos camundongos. O tratamento com dexametasona também reduziu a produção das citocinas TNF α e IL-1 β no tecido subcutâneo plantar dos animais (Figura 17).

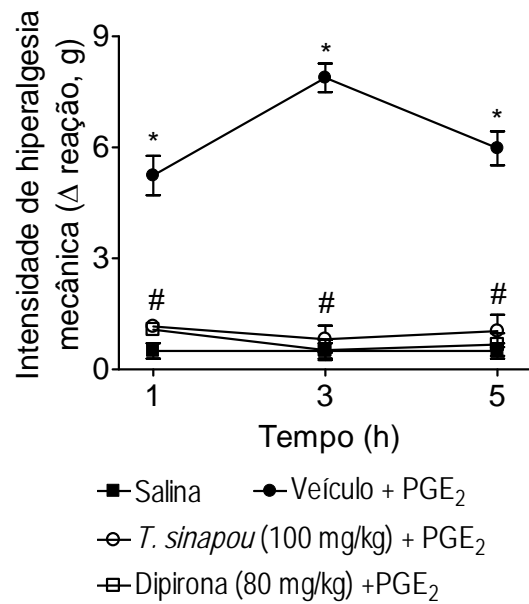
Figure 17 - EAE de *T. sinapou* reduz a produção de TNF α e IL-1 β induzida pela Cg. Os camundongos foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina), EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) ou dexametasona (dexta, 2 mg/kg) 30 minutos antes da administração i.pl. do estímulo, Cg (100 μ g/pata). O controle negativo foi a injeção i.pl. de salina (25 μ L). Amostras da pele da pata foram coletadas 2 horas após a injeção do estímulo e os níveis de TNF α (Painel A) e IL-1 β (Painel B) foram determinados por ELISA. Barras representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg.



4.3.4. EAE de *T. sinapou* Reduz a Hiperalgesia Mecânica Induzida pela PGE $_2$

O tratamento com o EAE de *T. sinapou* reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica na pata injetada com PGE $_2$ em todos os tempos avaliados, 1, 3 e 5 horas (Figura 18). O tratamento com a dipirona também bloqueou diretamente a hiperalgesia induzida pela PGE $_2$ (Figura 18).

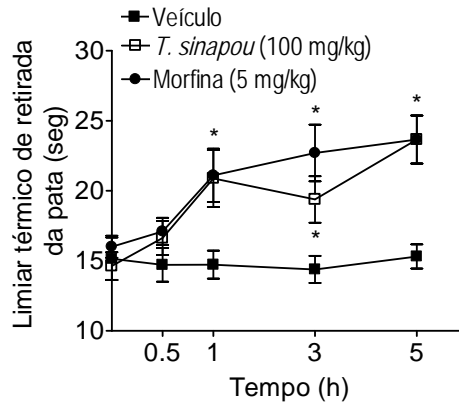
Figura 18 - EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂. Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg), veículo (20% de Tween 80 em salina) ou dipirona (80 mg/kg) 30 minutos antes da administração do estímulo, PGE₂ (100 ng/pata). O grupo controle negativo da hiperalgesia recebeu a injeção de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica foi mensurada 1, 3 e 5 horas, após a injeção de PGE₂, por um transdutor de pressão eletrônico. Os resultados são representados pela média ± EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + PGE₂.



4.3.5 EAE de *T. sinapou* Aumenta o Limiar Nociceptivo Térmico no Teste da Placa Quente

O EAE de *T. sinapou* não alterou o limiar nociceptivo térmico 30 minutos após o tratamento (Figura 19). No entanto 1 - 5 horas após o tratamento com o extrato foi observado um aumento significativo do limiar nociceptivo térmico dos animais no teste da placa quente. O tratamento com morfina (5 mg/kg) também aumentou o limiar nociceptivo térmico dos animais no teste da placa quente (Figura 19).

Figura 19 - EAE de *T. sinapou* aumenta o limiar nociceptivo térmico de camundongos no teste da placa quente. Os camundongos foram tratados i.p. com veículo (20% de Tween 80 em salina), EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg). A intensidade da nocicepção térmica foi mensurada 0,5 - 5 horas após os tratamentos usando o teste da placa quente. Os resultados são representados pela média \pm EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo.



4.3.6 EAE de *T. sinapou* Apresenta Efeitos Anti-hiperalgésicos e Reduz o Recrutamento de Neutrófilos de Maneira Dependente de Receptores Opióides

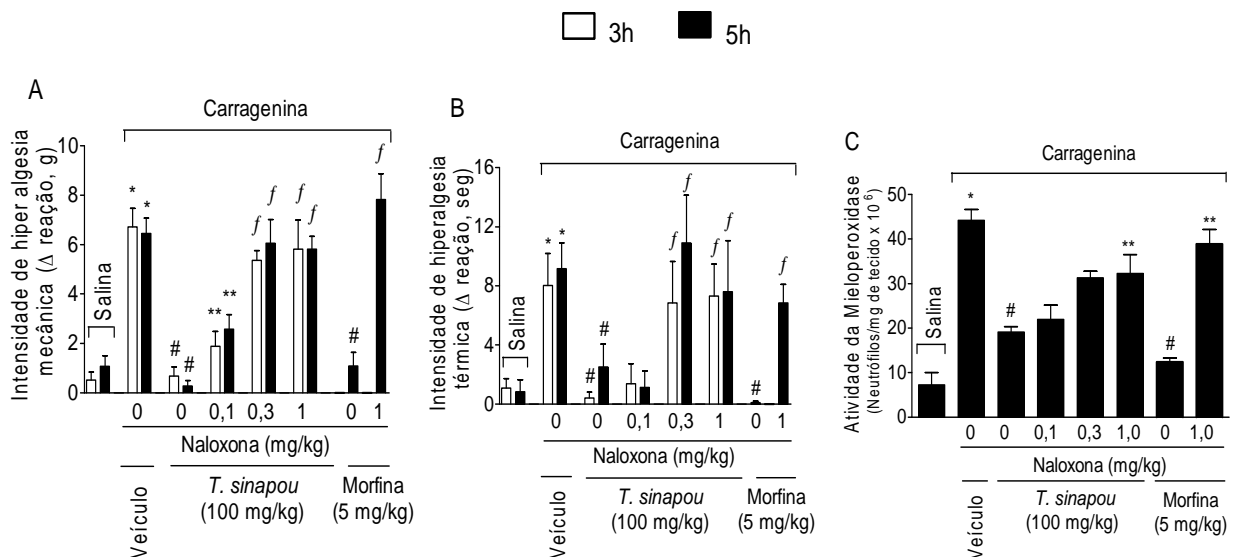
4.3.6.1 EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela Cg de maneira dependente de receptores opióides

O tratamento com naloxona (antagonista de receptor opióide) preveniu de maneira dose-dependente os efeitos anti-hiperalgésicos do EAE de *T. sinapou* na hiperalgesia mecânica (Figure 20 A) e térmica (Figure 20 B) induzida pela Cg, conforme mensurado 3 e 5 horas após a injeção da Cg. A dose de 0,1 mg/kg de naloxona preveniu os efeitos anti-hiperalgésicos do extrato de *T. sinapou* na hiperalgesia mecânica, porém não na hiperalgesia térmica em ambos os tempos avaliados (3 e 5 horas). As doses 0,3 e 1 mg/kg de naloxona inibiram significativamente os efeitos anti-hiperalgésicos do extrato na hiperalgesia mecânica (Figure 20 A) e térmica (Figure 20 B) quando comparado com a menor dose de naloxona testada (0,1 mg/kg), em ambos os tempos avaliados (Figure 20 A e 20 B).

4.3.6.2 EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido subcutâneo plantar induzido pela Cg de maneira dependente de receptores opióides

Houve um aumento significativo da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido pelo estímulo Cg no tecido da pata dos camundongos, o qual foi reduzido pelo tratamento com o EAE de *T. sinapou* (Figura 20 C). Foi observado que o tratamento com naloxona reverteu de maneira dose-dependente os efeitos inibitórios do extrato na atividade da MPO induzida pela Cg (Figura 20 C). A dose de 1 mg/kg de naloxona preveniu significativamente a redução da atividade da MPO pelo extrato de *T. sinapou* comparado com o grupo controle negativo para naloxona (Figura 20 C). O tratamento com naloxona (1 mg/kg) preveniu os efeitos anti-hiperalgésicos da morfina (5 mg/kg) na hiperalgesia mecânica e térmica (Figura 20 A e 20 B) e também os efeitos inibitórios sobre o infiltrado leucocitário da morfina (Figura 20 C).

Figure 20 - EAE de *T. sinapou* reduz a hiperalgesia mecânica e térmica e o recrutamento de neutrófilos de maneira dependente de receptores opióides. Os animais foram tratados com naloxona s.c. (0,1 - 1 mg/kg) ou salina 1 hora antes de serem tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg), veículo (20% de Tween 80 em salina) ou morfina (5 mg/kg). Após 30 minutos adicionais, os animais receberam a injeção do estímulo, Cg (100 µg/pata). O grupo controle negativo recebeu apenas a administração de salina (25 µL/pata). A intensidade da hiperalgesia mecânica (Painel A) e térmica (Painel B) foi mensurada 3 (barras abertas) e 5 horas (barras fechadas) após a injeção de Cg, por um transdutor de pressão eletrônico e pela placa quente respectivamente. A atividade da MPO (Painel C) foi avaliada 5 horas após a injeção de Cg por um ensaio colorimétrico cinético. Barras representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados. * $P < 0,05$ comparado com o grupo salina, # $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo + Cg, ** $P < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo de naloxona, e ^f $P < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo de naloxona e a dose de 0,1 mg/kg de naloxona.

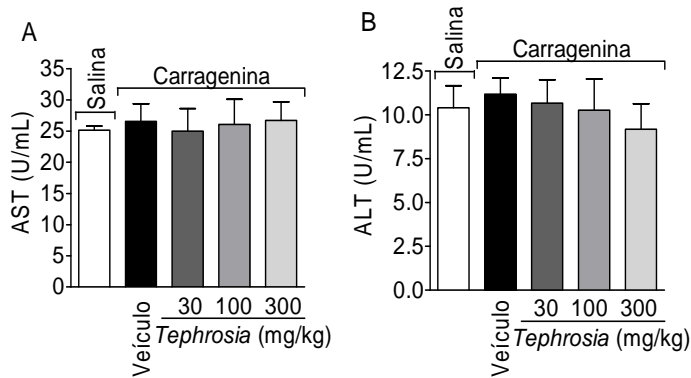


4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

4.4.1 EAE de *T. sinapou* não Altera os Níveis Séricos de AST e ALT

Pela determinação dos níveis séricos de AST e ALT 5,5 horas após o tratamento com o EAE de *T. sinapou* (30-300 mg/kg), não foram detectados sinais de toxicidade hepática, pois não houve diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 21 A e 21 B).

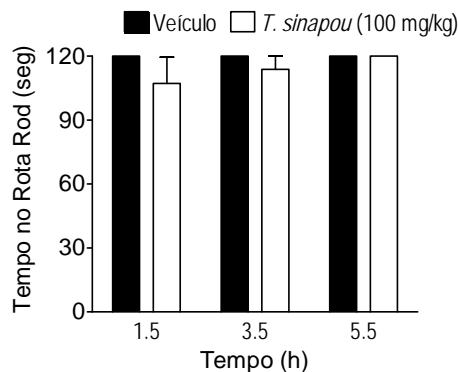
Figura 21 - EAE de *T. sinapou* não altera os níveis de AST e ALT. Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (30-100 mg/kg), ou veículo (20% de Tween 80 em salina). O grupo controle negativo recebeu apenas a injeção de salina. Os níveis séricos de AST e ALT foram determinados 5,5 horas após os tratamentos utilizando kits comerciais. Barras representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados.



4.4.2 EAE de *T. sinapou* não Altera a Atividade Locomotora

Não houve a indução de efeitos relaxantes musculares ou de efeitos tóxicos/sedativos que prejudiquem a atividade locomotora dos animais após o tratamento com o extrato de *T. sinapou* (100 mg/kg). Já que, não houve alteração no teste de rota - rod, 1,5, 3,5 e 5,5 horas após o tratamento com o extrato (Figura 22).

Figura 22 - EAE de *T. sinapou* não altera a atividade locomotora. Os animais foram tratados i.p. com o EAE de *T. sinapou* (100 mg/kg), ou veículo (20% de Tween 80 em salina). O desempenho motor foi avaliado após 1,5, 3,5 e 5,5 horas da injeção dos compostos pelo teste de rota - rod. Barras representam a média \pm EPM de 5 animais por grupo, e são representativas de 2 experimentos separados.



5 DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente é crescente o interesse em substâncias antioxidantes, já que antioxidantes exógenos são constantemente requeridos devido à queda e/ou consumo dos antioxidantes endógenos, para evitar os danos celulares. Os antioxidantes fenólicos compartilham um padrão químico em que um ou mais grupos fenólicos doam hidrogênio e neutralizam os radicais livres (ATOUI et al., 2005; SILVA et al., 2002). Para determinação da atividade antioxidante de compostos fenólicos ou de extrato de plantas contendo estas moléculas, vários métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos, e estes frequentemente dependem da geração de radicais livres (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005). Os métodos diferem em seu princípio e nas condições experimentais, e um único método não refletirá todos os antioxidantes e mecanismos presentes em um extrato (LI et al., 2009). Assim, para elucidar o potencial antioxidante do extrato de *T. sinapou* foi utilizado diferentes metodologias.

A habilidade de compostos em transferir elétrons é um indicador significativo de que este age como um potencial antioxidante (MEIR et al., 1995). O método de FRAP avalia a redução do complexo Fe^{+3} -TPTZ para um produto colorido. A presença de amostras redutoras tais como substâncias antioxidantes causam a redução do ferro de Fe^{3+} para Fe^{2+} . O método de FRAP detecta compostos com potencial redox $< 0,7\text{V}$ (o potencial redox do Fe^{+3} -TPTZ) e o poder redutor mostra estar relacionado com o grau de hidroxilação e extensão de conjugação dos polifenóis (SÁNCHEZ-GONZALEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005). Como $1 \mu\text{g/mL}$ do EAE de *T. sinapou* apresentou poder redutor equivalente a $0,32 \mu\text{mol/L}$ do antioxidante sintético o Trolox, estes resultados indicam que o extrato apresenta potencial antioxidante. Substâncias que apresentam poder redutor no teste do FRAP refletem os níveis plasmáticos dos antioxidantes ácido ascórbico, ácido úrico e α -tocoferol (BENZIE; STRAIN, 1996).

O radical orgânico aniônico DPPH^{*}, tem sido amplamente utilizado para a determinação da atividade antioxidante. Devido à presença de um elétron desemparelhado, o DPPH^{*} possui uma forte absorção em 517 nm, assim que o elétron torna-se pareado a absorção diminui estequiometricamente, proporcional à concentração da (s) substância (s) com potencial antioxidante presente na solução teste (BLOIS, 1958). A mudança na absorbância produzida na reação é utilizada para determinar a capacidade de compostos em

doar átomos de hidrogênio aos radicais livres, e desta forma promover o pareamento do elétron não pareado responsável pela reatividade do radical (IGBINOSA et al., 2011).

A concentração do EAE de *T. sinapou* (142 µg/mL) necessária para sequestrar 50 % do radical aniônico DPPH[•] formado no teste foi aproximadamente 120 vezes maior do que a concentração de quercetina (1,17 µg/mL), a droga controle utilizada. Este resultado pode ser atribuído ao fato de a quercetina ser um flavonóide isolado enquanto o extrato de *T. sinapou* contém flavonóides, mas pode conter também diversas outras substâncias que interferem na atividade antioxidante. Em um estudo realizado por GEORGETTI et al. (2007) a concentração de Isoflavin Beta[®], um extrato comercial padronizado rico em isoflavonóides, necessária para sequestrar 50 % do radical DPPH[•] formado no teste foi de 160 µg/mL, bem próxima da concentração do EAE de *T. sinapou*.

Outro ensaio operacionalmente simples utiliza o radical orgânico catiônico ABTS⁺, e monitora o decaimento da absorvância deste radical por amostras antioxidantes. Substâncias que atuam neste teste correlacionam-se com os níveis endógenos de glutathiona (KANG; SALTVEIT, 2002). As concentrações do EAE de *T. sinapou* e da quercetina necessárias para sequestrar o radical catiônico ABTS⁺ foram menores em relação às necessárias para sequestrar o radical aniônico DPPH[•]. Para sequestrar 50 % do radical catiônico ABTS⁺ formado no teste foi necessário uma concentração do extrato de *T. sinapou* (54,51 µg/mL) aproximadamente 60 vezes maior do que a concentração de quercetina (0,83 µg/mL). Estes resultados indicam que tanto o extrato de *T. sinapou* como a quercetina apresentam atividade sequestradora de radicais livres carregados negativamente e positivamente, e esta atividade pode ser atribuída à forte habilidade doadora de hidrogênio. Isto implica que o EAE de *T. sinapou* pode ser utilizado para tratamento de danos patológicos relacionados com radicais livres, ou seja, pode inibir o estresse oxidativo.

A LPO é uma reação em cadeia mediada por radicais livres, e seus produtos primários são os peróxidos (ROOR') ou hidroperóxidos (ROOH), compostos frequentemente instáveis que se decompõem em aldeídos, cetonas e outras subestruturas reativas. Neste contexto, foi avaliado se o EAE de *T. sinapou* inibe a LPO nas etapas iniciais, pela determinação da atividade sequestradora de ROOH pelo extrato. Os ROOH foram formados a partir da utilização do ácido linoléico, um ácido graxo poliinsaturado, em uma metodologia independente de ferro (LINGNERT; VALENTIN; ERICKSON, 1979). A concentração do EAE de *T. sinapou* (8,53 µg/mL) necessária para sequestrar 50 % dos ROOH formados no ensaio foi apenas 16 vezes maior que a concentração de quercetina (0,51 µg/mL). Esses resultados demonstram que o extrato de *T. sinapou* inibe a LPO nas etapas iniciais com IC₅₀

mais próximo do flavonóide isolado, a quercetina, em comparação aos outros métodos já apresentados.

Com o intuito de avaliar se o EAE de *T. sinapou* é também capaz de inibir a LPO nas etapas de propagação e terminação, foi utilizada outra metodologia, que induz a LPO utilizando o sistema mitocondrial/ Fe^{2+} /citrato. Na presença de Fe^{2+} a LPO mitocondrial pode ser diretamente iniciada pela geração do HO^\bullet , por meio da quebra do H_2O_2 de acordo com a reação de Fenton ou pela formação de complexos entre o oxigênio e os diferentes estados redox do ferro (OZGOVÁ; HERMÁNEK; GUT, 2003). Portanto, em um homogenato mitocondrial, livre da presença de peróxidos, a LPO pode ser iniciada pela retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica, pelo HO^\bullet , por exemplo, formando o R^\bullet . Este reage rapidamente com o oxigênio molecular, gerando o ROO^\bullet (Figura 2, equação 1), o principal promotor da LPO, que tem como produtos finais álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de ROOH (MARTINEZ, 1995; BUEGE; AUST, 1978). Os produtos finais da LPO, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), foram quantificados pela reação com o TBA, por formarem um complexo rosa que absorve em 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

O EAE de *T. sinapou* inibiu em 50 % a formação de TBARS (produtos finais da peroxidação lipídica) em relação ao controle positivo, na concentração de 20,10 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que a quercetina na concentração de 0,34 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente 60 vezes menor, inibiu 50 % da formação de TBARS em relação ao controle positivo. Segundo [Visavadiya et al \(2010\)](#) o extrato etanólico da raiz de *Asparagus racemosus*, uma planta rica em flavonóides, inibiu em 50 % a formação de TBARS neste teste com uma concentração de 309 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstra que o extrato de *T. sinapou* apresenta uma alta atividade antioxidante nesta metodologia, uma vez que apresentou um IC_{50} cerca de 15 vezes menor quando comparado a este extrato. Assim, o EAE de *T. sinapou* apresenta atividade inibidora da LPO nas etapas de propagação e terminação, porém é preciso uma concentração um pouco maior de extrato em relação à concentração que inibiu as etapas iniciais da LPO. Com esta metodologia não é possível distinguir se a atividade inibidora da LPO induzida por Fe^{2+} ocorreu pelo sequestro dos radicais livres formados durante a LPO (exemplo: ROO^\bullet), e/ou pela quelatação do metal de transição adicionado à reação. Assim, avaliou-se também apenas a atividade queladora de Fe^{2+} , uma vez que este íon é um efetivo pró-oxidante.

A ruptura da homeostase de íons metálicos está envolvida no desenvolvimento de diversas doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Embora vital quando presente em excesso o íon ferro pode ser tóxico (LEE; ANDERSEN; KAUR, 2006).

O rompimento da homeostase de íons metálicos como o Fe^{2+} pode descontroladamente formar EROs deletérios, que participam do aumento da LPO, de modificações das bases nitrogenadas do DNA e das proteínas (GUTTERIDGE, 1995; VALKO et al., 2007). Um dos mecanismos dos efeitos tóxicos do Fe^{2+} é a reação de Fenton, que gera HO^{\bullet} . Substâncias antioxidantes, como os flavonóides podem proteger contra a toxicidade dos metais, por exemplo, por meio da quelação de Fe^{2+} , de forma a prevenir as reações deste com o oxigênio e/ou peróxidos, manter o seu estado redox e deixá-lo incapaz de reduzir o oxigênio molecular e por fim deter a formação de radicais livres (JOMOVA; VALKO, 2011).

O EAE de *T. sinapou* inibiu a formação do complexo $\text{Fe}_2(\text{BPS})_3$, por meio da formação, por exemplo, do complexo Fe-flavonóide. A concentração do extrato de *T. sinapou* (1,34 mg/mL) necessária para quelar 50 % de Fe^{2+} presente na solução teste foi muito maior do que a concentração de quercetina (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estes resultados demonstram que o extrato de *T. sinapou* apresenta atividade queladora de Fe^{2+} , porém é necessária uma concentração maior de extrato em relação aos outros testes antioxidantes realizados. O flavonóide quercetina também apresentou menor atividade queladora de Fe^{2+} (IC_{50} maior) em comparação aos outros testes antioxidantes realizados.

Estes resultados demonstram não apenas que o EAE de *T. sinapou* pode inibir o estresse oxidativo por apresentar atividade antioxidante, mas que seus mecanismos envolvem poder redutor, sequestro de radicais livres carregados negativamente e positivamente, quelação de Fe^{2+} e inibição da LPO independente e dependente de Fe^{2+} . A inibição da LPO ocorre principalmente nas etapas iniciais, e também nas etapas de propagação e terminação, já que o extrato inibiu em baixas concentrações a formação de ROOH e ROO^{\bullet} , espécies oxidantes geradas em nosso organismo envolvidas na desestabilização das membranas celulares e até lise e morte das células. Evidências suportam que, substâncias com esses mecanismos de atividade antioxidante previnem a ativação de fatores de transcrição envolvidos na produção de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas (SOUTO et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009a; VICENTINI et al., 2011).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Sabe-se que os flavonóides são compostos fenólicos antioxidantes, e esta atividade antioxidante pode explicar, pelo menos em partes, outros efeitos dos flavonóides na modulação da inflamação (SOUTO et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009a; VICENTINI et al., 2011). Ainda, há evidências que os rotenóides isolados (isoflavonóides presentes no extrato

de *T. sinapou*) apresentam atividade anti-inflamatória ([PEREIRA-DA-SILVA; PAZ-PARENTE, 2002](#)). É bem estabelecido que haja uma relação entre o estresse oxidativo e a produção de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas. Por exemplo, o estresse oxidativo ativa o fator de transcrição NF- κ B, o qual induz a produção de citocinas (VICENTINI et al., 2011). Estes mediadores inflamatórios induzem o recrutamento de leucócitos ao foco inflamatório, o que pode levar à lesão tecidual (VERRI et al., 2010).

Os neutrófilos são os leucócitos predominantes nas primeiras 6 - 24 horas da inflamação. Após esse período, os neutrófilos iniciam um processo de morte programada (apoptose), sendo em seguida fagocitado por macrófagos. A partir da décima hora surgem progressivamente os eosinófilos, macrófagos e linfócitos, permanecendo por cerca de uma semana no local, isto se o agente agressor for removido, caso contrário, ocorre a cronificação do processo (GALLIN; SNYDERMAN, 1999). Os leucócitos são recrutados por citocinas (exemplo: TNF α e IL-1 β) e são requeridos para fagocitar ou eliminar agentes infecciosos no foco inflamatório. No entanto, a inflamação excessiva pode levar à lesão tecidual (LE MOS et al., 2009; VERRI et al., 2007a; 2010). O recrutamento de leucócitos é inibido por moléculas como o NO, o qual diminui a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que reduz o rolamento, a adesão e a transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (TSAO et al., 1996).

Os neutrófilos utilizam o sistema MPO H₂O₂/Cl⁻ para gerar ácido hipocloroso (HOCl) e outros oxidantes clorados como um mecanismo de defesa celular e também como um mecanismo que pode levar a lesão tecidual (HAZEN et al., 1996; KLEBANOFF; CLARK, 1978; WEISS, 1989; WEISS; LAMPERT; TEST, 1983). Desta forma, o recrutamento de neutrófilos pode ser determinado pela contagem de células e também pela atividade da MPO.

O tratamento dos animais com o EAE de *T. sinapou* reduziu de maneira dose-dependente o recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos induzido pela Cg de maneira semelhante ao glicocorticóide prednisolona. A Cg é um modelo clássico de peritonite utilizado para provocar inflamação dependente de citocinas, sendo a TNF- α uma das primeiras citocinas a serem liberadas, sucedida pela IL-1 β (CUNHA et al., 2005). Vale ressaltar que, outras moléculas também participam da inflamação induzida pela Cg como a CXCL1 (KC, quimiocinas derivada de queratinócitos) (CUNHA et al., 2005). Desta forma, os resultados apresentados pelo tratamento com o extrato de *T. sinapou*, corroboram seus efeitos anti-inflamatórios, possivelmente relacionados com a redução da produção de citocinas quimiotáticas.

Para se validar uma droga em ensaios pré-clínicos como possível candidata a ensaios clínicos, é necessário demonstrar os seus efeitos em uma ampla variedade de modelos inflamatórios, bem como demonstrar seu mecanismo de ação. Neste contexto, o EAE de *T. sinapou* reduziu também o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos para o foco inflamatório induzido por outros estímulos inflamatórios: o zimosan, o LPS e o glicogênio. Diversas evidências indicaram que o tratamento com extratos de plantas contendo flavonóides ou com flavonóides isolados reduzem o recrutamento de células para o foco inflamatório induzido por vários estímulos inflamatórios ([ALGHAITHY et al., 2011](#); [LEIRO et al., 2010](#); [ORLANDI et al., 2011](#); [SOUTO et al., 2011](#)).

A injeção de zimosan induz o recrutamento leucocitário, devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ([LI et al., 2010](#); [SATO et al., 2003](#)) e IL-1 β ([KOLACZKOWSKA et al., 2001](#); [LI et al., 2010](#)) e aumento da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) relacionado ao mecanismo microbicida dos macrófagos ([AJUEBOR et al., 1998](#)). O LPS também induz a produção destas citocinas pró-inflamatórias, e sabe-se que esta endotoxina ativa aproximadamente 100 fatores de transcrição, sugerindo uma rede regulatória complexa dos genes induzidos por esta endotoxina ([ALVES-FILHO et al., 2010](#); [ROACH et al., 2007](#)). E por último, o glicogênio também é um modelo de peritonite que induz o recrutamento leucocitário dependente de citocinas e da expressão de moléculas de adesão ([MULLIGAN et al., 1998](#)). Desta forma, estes resultados demonstram que o tratamento com o EAE de *T. sinapou* reduz o recrutamento leucocitário ao foco inflamatório induzido por uma variedade de estímulos inflamatórios, o que novamente corrobora o benefício deste extrato em doenças inflamatórias assim como sua ampla aplicabilidade.

Estes modelos experimentais utilizados para estudar o recrutamento de leucócitos ao foco inflamatório induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Neste contexto, foi investigado se o tratamento dos animais com o extrato de *T. sinapou* reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias clinicamente relevantes, TNF α e IL-1 β , envolvidas nos modelos de inflamação avaliados no estudo. O tratamento com o EAE de *T. sinapou* praticamente aboliu a produção de TNF α e IL-1 β no exsudato peritoneal dos camundongos. Estas citocinas são alvos terapêuticos clinicamente comprovados para diminuir a inflamação, como observado na artrite reumatóide com os medicamentos infliximabe (anticorpo anti-TNF α) etanercepte (receptor solúvel do TNF α) e anakinra (antagonista do receptor de IL-1 β) ([VERRI et al., 2006b](#); [2010](#)).

Vale enfatizar que, estas citocinas, TNF α e IL-1 β , se interligam com os radicais livres produzidos durante a inflamação, pois radicais livres podem ativar o NF κ B, o

qual aumenta a transcrição de genes para produção de citocinas pró-inflamatórias (BONIZZI; KARIN, 2004; GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). Ademais, estudos mostraram que os flavonóides inibem a expressão dos genes para estas citocinas quimiotáticas (HUANG et al., 2011; LEIRO et al., 2010; VICENTINI et al., 2011). Desta forma, é possível afirmar que, um dos mecanismos envolvidos na redução do recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório pelo extrato de *T. sinapou* são dependentes da redução da produção das citocinas quimiotáticas TNF α e IL-1 β .

Mecanicamente, a redução do recrutamento leucocitário pelo extrato de *T. sinapou* mostrou-se dependente da produção de NO, desde que foi prevenida pelo tratamento com L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase. A biodisponibilidade de NO pode inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B pelo aumento da expressão do inibidor kappa B (I κ B) e diminuição da translocação nuclear da subunidade p50 (ZHEN; LU et al., 2008).

Sabe-se que, inibidores de eNOS, aumentam a adesão de neutrófilos à células endoteliais, enquanto doadores de NO diminuem a adesão e transmigração de leucócitos ao foco inflamatório (GUIDOT et al., 1996; KOSONEN et al., 1999; LELAMALY et al., 2001, TSAI et al., 2011). Por outra lado, o aumento da produção de NO derivado da iNOS tem sido mostrado induzir a ativação do NF- κ B, o que consequentemente leva ao aumento de vários mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de leucócitos (TSAI et al., 2011). Vale ressaltar que, a produção de grandes quantidades de NO é importante na defesa contra invasores celulares ([EISERICH](#) et al., 1998), e é bem estabelecido que citocinas como TNF α e IL-1 β induzem a iNOS (CUNHA et al., 1994).

Os flavonóides são compostos antioxidantes que inibem o O₂^{•-}, e consequentemente reduzem a expressão da iNOS por inibir a ativação do NF- κ B ([FRANCESHELLI](#) et al., 2011). Sabe-se também que os flavonóides estimulam a produção de NO nas células endoteliais por ativar a eNOS (CHEN et al., 2010; [RIZZA](#) et al., 2011). Neste contexto, é possível que o EAE de *Tephrosia sinapou* ative a eNOS, mas com os resultados apresentados neste trabalho é possível afirmar apenas que os efeitos anti-inflamatórios do extrato são dependentes da NOS, já que o L-NAME é um inibidor das três isoformas de NOS.

Evidências suportam que a quantidade de NO bioativo é reduzida pelo estresse oxidativo (FÖRSTERMANN et al., 2010), uma vez que o NO pela associação com O₂^{•-}, forma o ONOO[•], o que prejudica a sinalização do NO (DORONZO et al., 2011). Neste contexto, não pode ser excluído que o extrato de *T. sinapou* age como um antioxidante aumentando, pelo menos em parte, a sinalização de NO, por exemplo, pela redução do O₂^{•-}, e

não necessariamente aumentando a produção de NO, pela ativação da NOS.

Em suma, estes resultados demonstram que o tratamento com o EAE de *Tephrosia sinapou* reduz o recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos induzidos por uma variedade de estímulos inflamatórios, o que corrobora a sua ampla aplicabilidade. Ademais, os mecanismos envolvidos na redução do recrutamento de leucócitos pelo extrato podem estar relacionados com a inibição do estresse oxidativo e da ativação do NF- κ B e a consequente redução da produção das citocinas quimiotáticas, TNF α e IL-1 β , e também com o aumento da sinalização do NO no endotélio, por ativar a NOS e/ou por facilitar os efeitos do NO no endotélio, devido à inibição do O₂[•]. Uma figura esquemática resume as hipóteses destes resultados além dos outros resultados discutidos posteriormente (Figura 23).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Durante um processo inflamatório o recrutamento de neutrófilos libera mediadores hiperalgésicos diretos, como a PGE₂ (CUNHA et al., 2008a). Assim, substâncias que reduzem o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório, como o extrato de *T. sinapou*, tornam-se uma alternativa para o controle da dor inflamatória.

Em metodologias experimentais que empregam estímulos dolorosos em animais, os quais apresentam reações comportamentais compatíveis com a sensação de dor, não é possível determinar objetivamente se a sensação apresentada pelo animal é realmente de dor, já que este não pode se comunicar, assim prefere-se denominar estas reações como nocicepção, resultado da ativação das vias nociceptivas. Neste contexto, estímulos dolorosos induzem a liberação de mediadores que ativam os nociceptores a uma resposta comportamental considerada nociceptiva, por ser inibida por fármacos analgésicos.

O tratamento dos animais com o EAE de *T. sinapou* inibiu de maneira dose-dependente as respostas comportamentais nociceptivas (contorções abdominais) induzidas pelos estímulos ácido acético e PBQ. Da mesma forma, o tratamento com a indometacina (inibidor da ciclooxigenase) também inibiu a nocicepção manifesta nestes testes, o que corrobora com a participação de prostanóides nestes modelos nociceptivos (GOTO et al., 1998). Diversas evidências mostraram que flavonóides isolados ou extratos de plantas ricos em flavonóides inibem estas respostas comportamentais nociceptivas ([BONKANKA; SÁNCHEZ-MATEO](#); DE CAMPOS-BUZZI et al., 2006; KUPELI et al., 2006; MOHAMAD et al., 2010; [RABANAL](#), 2011; [SANNIGRAHI](#) et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009).

Os modelos experimentais de contorções abdominais induzidas por ácido

acético e PBQ são métodos simples e rápidos para triagem de novas drogas, e ao mesmo tempo estes métodos envolvem mecanismos complexos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e abertura de canais iônicos (VERRI et al., 2007b; 2008a). Embora os estímulos ácido acético e PBQ induzam uma resposta comportamental similar, há mecanismos diferentes envolvidos entre eles. Por exemplo, a IL-18 e a endotelina participam da nocicepção induzida por PBQ, mas não por ácido acético (GRISWOLD et al. 1999; VERRI et al., 2008a). Um denominador comum destes modelos é a participação de prostanóides, outras citocinas e a susceptibilidade de tratamento com opióides (VERRI et al., 2007b; 2008a).

Interessantemente, houve diferença nos efeitos antinociceptivos do extrato de *T. sinapou* dependendo da via de administração. A ordem descendente de atividade antinociceptiva foi i.p. > v.o. > s.c., portanto não há perda significativa por via oral. Como os efeitos da v.o. foram significativamente maiores que da via s.c. é possível considerar que há diferenças farmacocinéticas nos compostos presentes no extrato de *T. sinapou* e que a viabilidade destes compostos no trato gastrointestinal modulam os efeitos antinociceptivos do extrato. Esses resultados corroboram com Halliwell (2005) em que os efeitos protetores dos flavonóides e outros compostos fenólicos podem ocorrer dentro do trato gastrointestinal.

No modelo de nocicepção manifesta (flinches e lambida da pata) induzida pela formalina o tratamento com o extrato de *T. sinapou* também foi efetivo. Este resultado corrobora com efeitos de extratos de plantas contendo flavonóides ou de flavonóides isolados (BONKANKA; SÁNCHEZ-MATEO; DE CAMPOS-BUZZI et al., 2006; HEIDARI et al., 2009; MOHAMAD et al., 2010). O teste da formalina se caracteriza por duas fases, em que a primeira fase, neurogênica, primeiros 5-10 minutos, é considerada ser de efeitos diretos da formalina nos receptores de potencial transitório com domínios anquirina 1 (TRPA1), membro de uma família de canais catiônicos, expresso em um subgrupo de neurônios nociceptivos primários (MCNAMARA et al., 2007). E a segunda fase do teste da formalina, inflamatória, depende da produção local de citocinas e outros mediadores inflamatórios (CHICHORRO et al., 2004). Evidências indicam que mediadores como a bradicinina (CHICHORRO et al., 2004; CORREA; CALIXTO, 1993), citocinas: TNF α e IL-1 β , IL-6 e IL-8 (CHICHORRO et al., 2004; WORDLICZEK et al., 2000), aminas simpáticas (CHICHORRO et al., 2004; FUCHS et al., 1999) e prostanóides, mas não leucotrienos (CHICHORRO et al., 2004; MALMBERG; YAKSH, 1995) participam de uma ou ambas as fases do teste de nocicepção manifesta induzida pela formalina. Assim, como o extrato de *T. sinapou* foi efetivo em ambas as fases do teste de nocicepção manifesta induzida pela

formalina é possível que, este atue por meio da redução da produção de diferentes mediadores hiperalgésicos, de ação direta e/ou indireta nos receptores neuronais, e/ou ainda por interagir com os TRPA1, de forma a reduzir a nocicepção induzida pela formalina. O tratamento com o opióide morfina também inibiu ambas as fases do teste de nocicepção manifesta induzida pela formalina, conforme previamente descrito por [Shibata et al. \(1989\)](#).

O tratamento com o extrato de *T. sinapou* inibiu também o comportamento nociceptivo de número de flinches e tempo de lambida da pata induzido por CFA (*Mycobacterium tuberculosis* inativa). Evidências indicam que a nocicepção manifesta induzida por CFA é resultado de uma liberação sequencial dos mediadores: TNF α - IL-1 β - fator de crescimento do nervo (NGF) e por fim a sensibilização direta dos nociceptores, devido à estimulação da produção de prostanóides (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Assim, o extrato de *T. sinapou* pode atuar como um agente antinociceptivo, por inibir a produção e/ou ação destes diferentes mediadores hiperalgésicos. Ademais, estudos mostraram que os níveis de TNF α mantêm-se elevados em 5 dias após a injeção i.pl. de CFA em ratos (WOOLF et al., 1997), desta forma este estímulo é um modelo de hiperalgesia persistente, e por isso foi utilizado também como um modelo de pós-tratamento neste estudo.

Para exemplificar melhor o processo inflamatório e mais especificamente a hiperalgesia, foi utilizado também o modelo de Cg, administrada i.pl.. Como já citado anteriormente, a Cg desencadeia a produção de mediadores pró-inflamatórios, que induzem a hiperalgesia. Ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ocorre também a liberação de citocinas anti-inflamatórias que modulam o desenvolvimento da resposta inflamatória como a IL-10, a qual inibe a produção de TNF α e IL-1 β (VERRI et al 2006b).

O tratamento com o EAE de *T. sinapou* reduziu a hiperalgesia mecânica no pré e pós-tratamento, como observado nos modelos com Cg e CFA, respectivamente. O tratamento com indometacina também foi efetivo na redução da hiperalgesia nestes testes, o que corrobora a participação de prostanóides nestes modelos. Os modelos de hiperalgesia inflamatória induzida por Cg e CFA são extensivamente utilizados em estudos pré-clínicos na busca de novas drogas e seus mecanismos de ação. Estudos mostraram que flavonóides e extratos de plantas padronizados ricos em flavonóides inibem a hiperalgesia nestes modelos (VALÉRIO et al., 2009; QUINTÃO et al., 2011). Desta forma, substâncias que inibem a hiperalgesia nestes modelos, como demonstrado pelo extrato de *T. sinapou*, consistem em achados importantes com promissora aplicabilidade.

É bem estabelecido que na hiperalgesia induzida por Cg e CFA há a

participação de citocinas (CUNHA et al., 2005; CUNHA et al., 2010b; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995; VERRI et al., 2007b). Neste contexto, o tratamento com o extrato de *T. sinapou* reduziu a produção de citocinas hiperalgésicas (TNF α e IL-1 β) induzidas pela Cg no tecido subcutâneo plantar dos animais assim como na cavidade peritoneal. Estas citocinas são mediadores cruciais da dor, participam indiretamente da sensibilização dos nociceptores e estão envolvidas em modelos de nocicepção manifesta, hiperalgesia mecânica e térmica, o que sugere estes mediadores como alvos terapêuticos potenciais (VERRI et al., 2006b). Então, a redução da produção destas citocinas pelo extrato de *T. sinapou* além de demonstrar um mecanismo anti-inflamatório é também um anti-hiperalgésico efetivo na hiperalgesia inflamatória, capaz de prevenir a sensibilização dos nociceptores.

A redução da produção das citocinas TNF α e IL-1 β pelo extrato de *T. sinapou* foi semelhante a do glicocorticóide dexametasona. Os glicocorticóides atuam no núcleo celular e induzem a expressão de diferentes moléculas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o I κ B (SCHEINMAN, et al., 1995). Esta classe de medicamentos também promove a síntese e liberação do peptídeo anexina-1, o qual inibe a fosfolipase A2, e conseqüentemente bloqueia a ciclooxigenase-2 e a síntese de PGs (FERREIRA et al., 1997). As ciclooxigenases para produzir PGs utilizam como substrato o ácido araquidônico, este em condições normais encontra-se esterificado nos fosfolípidos da membrana celular, no entanto, durante um processo inflamatório são mobilizados pela ação da enzima fosfolipase A2 (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Desta forma, os glicocorticóides previnem a sensibilização dos nociceptores dependente da inibição da produção de mediadores hiperalgésicos.

Foi investigado também se o tratamento com o extrato de *T. sinapou* é capaz de bloquear a sensibilização dos nociceptores já instalada por um mediador hiperalgésico de ação direta, a PGE₂. De acordo com os resultados obtidos, a redução da hiperalgesia mecânica induzida pela PGE₂ indica que o extrato de *T. sinapou* também bloqueia a sensibilização dos nociceptores induzida por mediador hiperalgésico de ação direta nos nociceptores.

Estudos mostraram que os flavonóides aumentam o limiar nociceptivo térmico (MOHAMAD et al., 2010; SANNIGRAHI et al., 2011). Neste contexto, foi avaliado se o tratamento com o EAE de *T. sinapou* é eficaz em produzir antinocicepção em modelos de estímulos nocivos térmicos, pelo teste da placa quente. Este modelo é sensível para drogas que atuam centralmente de forma que as respostas comportamentais dos animais de retirada da pata na placa quente são consideradas ser de efeitos supra-espinais (CHAPMAN et al., 1985; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; WOOLFRE; MACDONALD, 1944). O

modelo da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores (fibras C e A δ). Os receptores térmicos são membros da família dos receptores de potenciais transitórios e são denominados de receptores vanilóides, estes receptores são diretamente ligados a canais iônicos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Como o tratamento dos animais com o extrato de *T. sinapou* induziu a um aumento do limiar nociceptivo térmico no teste da placa quente, sugere-se que o extrato possa agir via mecanismos de ação supra-espinais, incluindo o opióide (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; CARVALHO et al., 2011).

De fato, o tratamento com naloxona, um antagonista dos receptores opióides preveniu de maneira dose-dependente os efeitos anti-hiperalgésicos do extrato de *T. sinapou* na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela Cg. O tratamento com o extrato de *T. sinapou* reduziu também o recrutamento de neutrófilos induzido pela Cg de maneira dependente de receptores opióides. Com relação à droga controle, a morfina, seus efeitos anti-hiperalgésicos e inibitórios sobre o infiltrado leucocitário também foram revertidos pelo tratamento com naloxona. Os opióides como a morfina além de serem analgésicos efetivos, reduzem o recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório (MARTIN et al., 2010). Eles podem reduzir o recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório, já que reduzem os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β (CLARK et al., 2007; WANG et al., 2005). Desta forma, o tratamento com o extrato de *T. sinapou*, assim como a morfina, reduz a hiperalgesia inflamatória por mecanismos de ação dependentes dos receptores opióides e também dependentes da redução de citocinas hiperalgésicas. Os resultados apresentados na Figura 20 mostram ainda uma relação entre a migração de neutrófilos para o foco inflamatório e a hiperalgesia mecânica e térmica, pois como já discutido, neutrófilos são fontes de mediadores hiperalgésicos (CUNHA et al., 2010b).

Os receptores opióides são encontrados, principalmente no SNC espinal, supra-espinal e periférico e também no trato gastrointestinal. Os opióides podem ser de origens naturais (ex.: morfina), semi-sintéticos (ex.: benzil-morfina), sintéticos (ex.: fentanil), ou endógenos, peptídeos produzidos naturalmente pelo corpo, por exemplo, endorfinas, encefalinas e dinorfinas. As drogas opióides usadas terapeuticamente apesar de não serem peptídeos possuem conformações semelhantes em solução às dos opióides endógenos, ativando os receptores em substituição destes (TRESCOT et al., 2008). Desta forma, é possível que os compostos presentes no extrato de *T. sinapou* ativem os efeitos fisiológicos dos receptores opióides, por atuarem diretamente nos receptores opióides e/ou indiretamente por induzirem a liberação de peptídeos opióides endógenos.

A naloxona é um antagonista de receptores opióides. Assim, o tratamento com o extrato de *T. sinapou* pode induzir efeitos dependentes da ativação de receptores opióides supra-espinais, já que o extrato aumentou o limiar nociceptivo térmico no teste da placa quente (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), mas também não se descarta a possibilidade da ativação de receptores opióides espinais. Ademais, como o tratamento com o extrato foi capaz de bloquear a sensibilização periférica dos nociceptores induzida por um mediador hiperalgésico de ação direta, a PGE₂, é possível que o extrato atue também por ativar efeitos dependentes de receptores opióides periféricos. Periféricamente, a ativação dos receptores opióides inibe a hiperalgesia por estimular a nNOS a produzir NO, o qual induz a abertura dos canais K⁺ e reverte a sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 2010a). Evidências indicam que flavonóides apresentam efeitos dependentes da ativação de receptores opióides, provavelmente por induzir a liberação de opióides endógenos (ANJANEYULU; CHOPRA, 2003) e ativam a nNOS (XU et al., 2011) e a eNOS (CHEN et al., 2010; RIZZA et al., 2011). Neste contexto, como o extrato de *T. sinapou* é rico em flavonóides é possível que este atue como um anti-hiperalgésico por ativar direta ou indiretamente (por induzir a liberação de opióides endógenos) os receptores opióides e por ativar as isoformas constitutivas da NOS (nNOS e eNOS), uma vez que seus efeitos anti-inflamatórios também mostraram-se dependentes da NOS.

Os opióides são analgésicos efetivos, e a ativação de mecanismos opióides endógenos pode evitar o uso excessivo de opióides. O uso clínico dos opióides é limitado devido a seus efeitos colaterais, como depressão respiratória, constipação, tolerância e dependência física (TRESCOT et al., 2008). Neste contexto, drogas que induzam efeitos dependentes da ativação de receptores opióides como o extrato de *T. sinapou*, podem representar uma abordagem terapêutica promissora (CUNHA et al., 2010a; CARVALHO et al., 2011).

Em suma, estes resultados demonstram que o tratamento com o extrato de *T. sinapou* induz uma resposta antinociceptiva em modelos de nocicepção manifesta e de hiperalgesia mecânica e térmica. Ademais, os mecanismos antinociceptivos do extrato podem estar relacionados com a redução da produção de citocinas hiperalgésicas (TNF α e IL-1 β), com a ativação das isoformas constitutivas da NOS e mostraram-se dependentes da ativação do sistema opióide endógeno. Uma figura esquemática resume as hipóteses destes resultados, além dos outros resultados discutidos anteriormente (Figura 23).

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Um viés nos estudos de substâncias antinociceptivas que deve ser descartado é a alteração no desempenho motor produzida por algumas substâncias, que pode ser erroneamente avaliada como ação antinociceptiva. Os resultados do teste de rota-rod permitem confirmar que a restauração do limiar nociceptivo é resultado da ação da administração do extrato de *T. sinapou*, e não decorrente de uma suposta alteração comportamental derivada de efeitos tóxicos/sedativos ou relaxantes musculares, que poderiam levar a um registro errôneo no processo de obtenção de resultados com o filamento de Von Frey, e nos outros testes antinociceptivos que dependem da movimentação dos animais. Este resultado corrobora com estudos anteriores dos efeitos de extratos de plantas contendo flavonóides ou de flavonóides isolados ([DALBÓ et al., 2005](#); [MOHAMAD et al., 2010](#), [VALÉRIO et al., 2009a](#)).

Evidências mostraram que extratos de *T. sinapou* apresentaram atividade ictiotóxica ([ANDEL, 2000](#)) e larvicida ([VASCONCELOS et al., 2009](#)) o que pode representar um risco de possíveis efeitos tóxicos. Contudo, pela determinação dos níveis séricos de AST e ALT nos camundongos não foram detectados efeitos hepatotóxicos após o tratamento com o extrato de *T. sinapou*. A utilização da atividade destes biomarcadores é um importante instrumento para monitorar em estudos pré-clínicos drogas que induzem danos hepáticos agudos ([OZER et al., 2008](#)). Desta forma, os flavonóides podem ser tóxicos para algumas espécies e ao mesmo tempo não serem tóxicos para humanos. Por último, é consenso que os efeitos benéficos dos flavonóides à saúde humana estão relacionados com seus efeitos antioxidantes ([CASAGRANDE et al., 2006b](#); [FRANCESCHELLI et al., 2011](#); [GEORGETTI et al., 2007](#); [HALLIWELL, 2000a, 2008](#); [PRATT; TALLMAN; PORTER, 2011](#)).

6 CONCLUSÕES

Este estudo fornece a primeira evidência pré-clínica dos mecanismos de atividade antioxidante, efeitos e mecanismos anti-inflamatórios e analgésicos do extrato de *Tephrosia sinapou*. O tratamento dos animais com o EAE de *T. sinapou* reduziu o recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos induzido por uma variedade de estímulos inflamatórios o que corrobora a ampla aplicabilidade deste extrato. Estes efeitos anti-inflamatórios podem estar relacionados com a inibição do estresse oxidativo pelo extrato, uma vez que o extrato apresenta atividade antioxidante em que seus mecanismos mostraram envolver poder redutor, sequestro de radicais livres carregados negativamente e positivamente, quelação de Fe^{2+} e inibição da LPO nas etapas de iniciação, propagação e terminação.

Os efeitos anti-inflamatórios do extrato podem também estar relacionados com a redução da produção das citocinas quimiotáticas $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, uma vez que o extrato apresenta atividade antioxidante o que previne a ativação de fatores de transcrição para citocinas quimiotáticas ou mesmo constituintes do extrato como os flavonóides podem inibir a ativação do $NF-\kappa B$ o que previne a produção de citocinas quimiotáticas. Ademais, os efeitos anti-inflamatórios do extrato podem estar relacionados com o aumento da sinalização do NO no endotélio, por ativar a NOS ou por facilitar os efeitos do NO no endotélio, devido à inibição do O_2^\bullet .

O tratamento dos animais com o EAE de *T. sinapou* inibiu também a o comportamento de nociceção manifesta induzido por diferentes estímulos, sendo ativo via i.p., v.o. e s.c. . Além disso, o tratamento com o extrato de *T. sinapou* reduziu a hiperalgesia inflamatória mecânica tanto no pré como no pós-tratamento. Estes efeitos anti-hiperalgésicos podem também estar relacionados com a redução da produção das citocinas hiperalgésicas $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$.

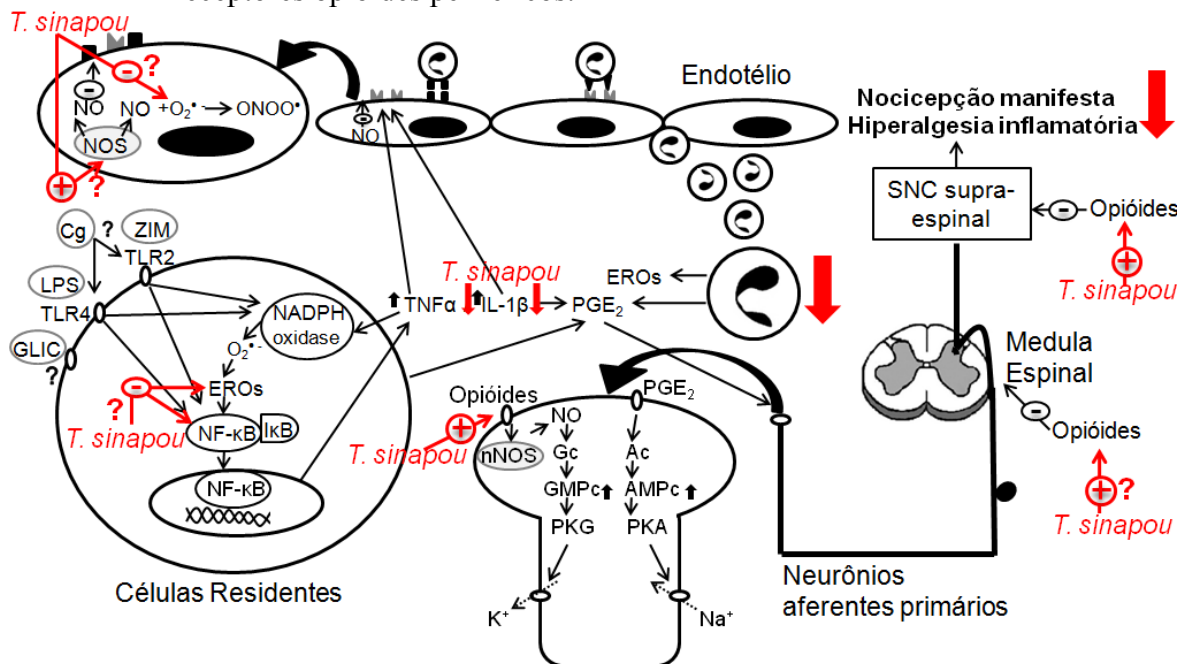
Os efeitos anti-hiperalgésicos do extrato de *T. sinapou* mostraram-se dependentes da ativação dos receptores opióides. O extrato de *T. sinapou* pode induzir efeitos dependentes da ativação dos receptores opióides supra-espinais, já que foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo térmico no teste da placa quente, mas também não se descarta a possibilidade de ativar os receptores opióides espinais. Ainda, como o tratamento com o extrato bloqueou a sensibilização dos nociceptores induzida por um mediador hiperalgésico de ação direta, a PGE_2 , é possível que o extrato atue também por ativar os efeitos dependentes dos receptores opióides periféricos. Ademais, como os efeitos anti-inflamatórios do extrato

mostraram-se dependentes da NOS, é possível que o extrato ative as isoformas constitutivas da NOS, a nNOS e a eNOS.

É importante ressaltar que, o tratamento dos animais com o extrato não alterou os níveis séricos de AST e ALT e o desempenho motor dos animais, o que descarta a possibilidade de efeitos hepatotóxicos e relaxantes musculares ou tóxicos/sedativos que prejudiquem a atividade locomotora.

Em suma, como diversas evidências indicam a presença de uma variedade de flavonóides e compostos novos em plantas do gênero *Tephrosia*, substâncias isoladas de plantas deste gênero, incluindo a espécie *T. sinapou*, são fontes promissoras de compostos terapêuticos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica, que merecem maiores investigações.

Figura 23 - EAE de *T. sinapou* apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. O tratamento dos animais com o extrato de *T. sinapou* reduziu o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório induzido por diferentes estímulos inflamatórios: Cg, zimosan (ZIM), LPS e glicogênio (GLIC). Os mecanismos envolvidos na redução do recrutamento de leucócitos podem estar relacionados com a inibição do estresse oxidativo (EROs) e da ativação do NF- κ B e a consequente redução da produção das citocinas TNF α e IL-1 β , e também com o aumento da sinalização do NO no endotélio, por ativar a NOS ou por facilitar os efeitos do NO, devido à inibição do O $_2^{\bullet}$. O extrato de *T. sinapou* também reduziu a nocicepção manifesta e a hiperalgesia inflamatória, e os seus mecanismos antinociceptivos podem estar relacionados com a redução da produção das citocinas TNF α e IL-1 β e mostraram-se dependentes da ativação dos receptores opióides. O extrato pode induzir efeitos dependentes dos receptores opióides supra-espinais, já que foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo térmico, mas também não se descarta a possibilidade de ativar os receptores opióides espinais, e como o extrato bloqueou a sensibilização dos nociceptores induzida pela PGE $_2$, é possível que atue também por ativar os receptores opióides periféricos.



REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, New York, v. 10, n. 2, p. 1-7, oct. 2008.
- AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyron. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 42, n. 2, p. 79-85, oct. 1999.
- AIKENS, J.; DIX, T. A. Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 23, p. 5091-5098, aug. 1991.
- AJUEBOR, M. N.; VIRÁG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABÓ, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation, **Immunology**, San Francisco, v. 95, n. 4, p. 625-630, dec. 1998.
- ALGHAITHY, A. A.; EL-BESHBISHY, H. A.; ABDELNAIM, A. B.; NAGY, A. A.; ABDEL-SATTAR, E. M. Anti-inflammatory effects of the chloroform extract of *Pulicaria gvestii* ameliorated the neutrophil infiltration and nitric oxide generation in rats. **Toxicology and Industrial Health**, Oxford, Epub ahead of print, apr. 2011.
- ALLEN, O.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae**. Madison WI: The University of Wisconsin Press. 1981.
- ALVES-FILHO, J. C.; SÔNEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A.; VERRI, W. A.Jr.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BASILE-FILHO, A.; MCKENZIE, N. A.; XU, D.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, New York, v. 16, p. 708-712, may 2010.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, sep. 1993.
- ANDEL, T. V. The diverse uses of fish-poison plants in Northwest Guyana. **Economic Botany**, New York, v. 54, n. 4, p. 500-512, mar. 2000.
- ANDRADE, M. A.; OLIVEIRA, J. P. R.; SANTOS, A. L. L. M.; FRANCO, C. R. P.; ANTONIOLLI, A. R.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 6, p. 262-968, dec. 2010.
- ANDREI, C. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUESFO, E. R. Dimethylchromene rotenoids from *Tephrosia candida*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1081-1085, nov. 1997.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; MORAES, L. A. B.; CARVALHO, M. G.; FILHO, R. B. C-prenylflavonoids from roots of *Tephrosia tunicata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 7, p. 799-804, dec. 2000.

ANDREI, C. C.; FARIA, T. J.; BOSSO, A. A.; ANIZELLI, P. R.; BRAZ-FILHO, R. Toxicarine, a new biflavonoid from the roots of *Tephrosia toxicaria*. Manuscript in preparation.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin, a biflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Progress In Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Elmsford, v. 27, n. 6, p. 1001-1005, sep. 2003.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin attenuates thermal hyperalgesia and cold allodynia in STZ-induced diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 42, n. 8, p. 766-769, aug. 2004.

ARRIAGA, A. M. C.; MALCHER, G. T.; LIMA, J. Q.; MAGALHÃES, F. E. A.; GOMES, T. M. B.; OLIVEIRA M. C. F.; ANDRADE, N. M.; MAFEZOLLI, J., SANTIAGO, G. M. P. Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Tephrosia cinerea* Pers. **The Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 5, p. 450-451, 2008.

ARRIAGA, A. M.; LIMA, J. Q. E.; VASCONCELOS, J. N.; DE OLIVEIRA, M. C.; LEMOS, T. L.; FONSECA, A. M.; MALCHER, G. T.; SANTIAGO, G. M.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R. Antioxidant and larvicidal activities of *Tephrosia egregia* Sandw against *Aedes aegypti*. **Natural Product Communications**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 529-530, apr. 2009a.

ARRIAGA, A. M.; LIMA, J. Q.; VASCONCELOS, J. N.; DE OLIVEIRA, M. C.; ANDRADE-NETO, M.; SANTIAGO, G. M.; UCHOA, D. E.; MALCHER, G. T.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R. Unequivocal assignments of flavonoids from *Tephrosia* sp. (Fabaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, London, v. 47, n. 6, p. 537-540, june 2009b.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; WEBER, K. C.; MELLO, P. H.; SILVA, A. B. A theoretical study on the chemopreventive activity of flavonoid compounds. **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, Galveston, v. 3, n. 12, p. 781-788, dec. 2004.

ASUNTHA, G.; PRASANNARAJU, Y.; SUJATHA, D.; PRASAD, KVSRG. Assessment of effect of ethanolic extract of *Tephrosia purpurea* (L.) Pers., Fabaceae, activity on lithium-pilocarpine induced *Status epilepticus* and oxidative stress in Wistar rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 767-772, oct. 2010.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 1, p. 37-36, jan. 2005.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, Basel, v. 78, n. 5, p. 431-41. dec. 2005.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, London, v. 239, n. 1, p. 70-76. jul. 1996.

- BICKFORD, P. C.; GOULD, T.; BRIEDERICK, L.; CHADMAN, K.; POLLOCK, A.; YOUNG, D.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 866, n. 1, p. 211-217, jun. 2000.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, apr. 1958.
- BOERSMA, B. J.; PATEL, R. P.; KIRK, M.; JACKSON, P. L.; MUCCIO, D.; DARLEY-USMAR, V. M.; BARNES, S. Chlorination and nitration of soy isoflavones. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 368, n. 2, p. 265-275, aug. 1999.
- BOLANM, B. J.; ULVIK, R. J. Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. Role of the superoxide radical. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 243, n. 1, p. 55-59, apr. 1987.
- BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 280-288, jun. 2004.
- BONKANKA, C. X.; SÁNCHEZ-MATEO CDEL, C.; RABANAL, R. M. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. **Journal of Natural Medicines**. New York, v. 65, n. 1, p. 122-8., jan. 2011.
- BOUSSETTA, T.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A., HAYEM, G.; CIAPPELLONI, S.; RAAD, H.; ARABI, DERKAWI, R.; BOURNIER, O.; KROVIARSKI, Y.; ZHOU, X. Z.; MALTER, J. S.; LU, P. K.; BARTEGI, A.; DANG, P. M.; EL-BENNA, J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. **Blood**, Basel, v. 116, n. 26, p. 5795-5802, oct. 2010.
- BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 59, n. 1, p. 13-23, jan. 2000.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, Cambridge, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 19, n. 7, p. 194-201, jul. 1986.
- CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL K; MULLOCK B. **Biochemical Toxicology**. Oxford, UK: IRL Press, 1987.
- CARVALHO, T. T.; FLAUZINO, T.; OTAGUIRI, E. S.; BATISTELA, A. P.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A.Jr. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) induces mechanical hyperalgesia via spinal activation of MAP kinases and PI(3)K in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 98, n. 2, 188-195, apr. 2011.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI-JR, W. A.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne v. 84, n.1 p. 21-27, jul. 2006a.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A., JR; JABOR, J. R.; SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, New York, v. 7, n.1 p. E1-E8, feb. 2006b.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, W. A., JR; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, n. 2, p. 183-190, jan. 2007.

CHANG, L. C.; GERHÄUSER, C.; SONG, L.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A.D. Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 6, n. 9 p. 869-873, sep. 1997.

CHANG, L. C.; CHÁVEZ, D.; SONG, L. L.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*. **Organic Letters**, Washington, v. 24, n. 4, p. 515-518, feb. 2000.

CHAPMAN, C. R.; CASEY, K. L.; DUBNER, R.; FOLEY, K. M; GRACELY, R. H; READING, A. E. Pain measurement: an overview. **Pain**, Amsterdam, n. 22, n. 1, p. 1-31, may 1985.

CHEN, C. C.; KE, W. H.; CENG, L. H.; HSIEH, C. W.; WUNG, B. S. Calcium- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin. **Life Science**, Basel, v. 87, n. 23, p. 743-749, dec. 2010.

CHI, X. X.; JIANG, X.; NICOL, G. D. ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE2-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. **Brain Research**, Amsterdam, v. 11, n. 1145, p. 28-40, may 2007.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 141, n. 7, 1175-1184, apr. 2004.

CHINNIAH, A.; MOHAPATRA, S.; GOSWAMI, S.; MAHAPATRA, A.; KAR, S. K.; MALLAVADHANI, U. V.; DAS, P. K. On the potential of *Tephrosia purpurea* as anti-Helicobacter pylori agent. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 124, n. 3, p. 642-645, jul. 2009.

CLARK, J. D.; SHI, X.; LI, X.; QIAO, Y.; LIANG, D.; ANGST, M. S.; YEOMANS, D. C. Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. **Molecular Pain**, London, v. 3, n.28, p. 1-12, oct. 2007.

CORREA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, London, v.110, n. 1, p.193-198, sep. 1993.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MOSS, D. W.; REES, D.; LEAL, L. M.; MONCADA, S.; CARRIER, M.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxemia: role of TNF- α and IL-1 β . **Immunology**, San Francisco, v. 81, n. 2, p. 211-215, feb. 1994.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 401-407, mar. 2004.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 5, 1755-1760, fev. 2005.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 4, p. 824-32, apr. 2008a.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; VALÉRIO, D. A.; GUERRERO, A. T.; NOGUEIRA, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **European Journal of Pain**, London, v. 12, n. 8, p. 1059-1068, nov. 2008b.

CUNHA, T.M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A. Jr.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, mar. 2010a.

CUNHA, T. M.; TALBOT, J.; PINTO, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, G. R.; GUERRERO, A. T.; SONEGO, F.; VERRI, W. A. Jr.; ZAMBONI, D. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. **Molecular Pain**, London, v. 6, n. 63, p 1-10, oct. 2010b.

DAMRE, A. S.; GOKHALE, A. B.; PHADKE, A. S.; KULKARNI, K. R.; SARAF, M. N. Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 3, p. 257-261, apr. 2003.

DALBÓ, S.; JÜRGENSEN, S.; HORST, H.; RUZZA, A. A.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, New York, v. 57, n. 6, p. 765-771, jun. 2005.

- DE CAMPOS-BUZZI, F.; PEREIRA DE CAMPOS, J.; POZZA-TONINI, P.; CORRÊA, R.; AUGUSTO-YUNES, R.; BOECK, P.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylone. **Archives of Pharmacy**, Weinheim, v. 339, n. 7, p. 361-365, jul. 2006.
- DESHPANDE, S. S.; SHAH, G. B.; PARMAR, N. S. Anti-ulcer activity of *Tephrosia purpurea* in Rats. **Indian Journal of Pharmacology**, Lucknow, v. 35, n. 1, p. 168-172, dec. 2003.
- DESHPANDE, S.; DAVE, P.; SHAH, G. Study of *Tephrosia purpurea* roots in bronchial asthma. **Indian Journal of Pharmacology**, Lucknow, v. 40, n. 2, p. 66-91, act. 2008.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 27-35, aug. 1999.
- DIAS, A.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Quercetin decreases oxidative stress NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 135, n. 10, p. 2299-2304, oct. 2005.
- DORONZO, G.; VIRETTO, M.; RUSSO, I.; MATTIELLO, L.; DI MARTINO L.; CAVALOT, F.; ANFOSSI, G.; TROVATI, M. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signaling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: Influence of insulin resistance and oxidative stress. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 216, n. 1, p. 44-53, may 2011.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, jan. 2002.
- DUARTE, I. D.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 221, n. 1, p. 171-4, oct. 1992.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 161-174, dec. 1977.
- EISERICH, J. P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, New York, v. 391, n. 6665, p. 393-397, jan. 1998.
- FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 105-114, jan. 2011.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions**, Amsterdam, v. 38, p. 7-9, 1993.

FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; MICHELIN, M. A.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; POOLE, S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 121, n. 5, p. 883-888, jul. 1997.

FERREIRA, S. R.; FERRARI, L. F.; CUNHA, T. M.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; VERRI, W. A. JR.; CUNHA, F. Q. Dor inflamatória. In: ALVES NETO, O.; COSTA, C.M.C.; TEIXEIRA, M.J. **Dor: Princípios e Práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 265-279.

FERREIRA, V. H.; NAZLI, A.; KHAN, G.; MIAN, M. F.; ASHKAR, A. A.; GRAY-OWEN, S.; KAUL, R.; KAUSHIC, C. Endometrial Epithelial Cell Responses to Coinfecting Viral and Bacterial Pathogens in the Genital Tract Can Activate the HIV-1 LTR in an NF- κ B- and AP-1-Dependent Manner. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 204, n. 2, p. 299-308, jul. 2011.

FILHO, A. W.; FILHO, V. C.; OLINGER, L.; SOUZA, M. M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research**, Korea, v. 31, n. 6, p. 713-721, jan. 2008.

FLÓREZ, J. Terapéutica Farmacológica del dolor. In FLÓREZ, J. **Dolor: mecanismos de transmission**. Madrid: 1993. p. 19-39.

FRANCESCHELLI, S.; PESCE, E. M.; VINCIGUERRA, I.; FERRONE, A.; RICCIONI, G.; PATRUNO, A.; GRILLI, A.; FELACO, M.; SPERANZA, L. Licocalchone-C extracted from *Glycyrrhiza glabra* inhibits lipopolysaccharide-interferon- γ inflammation by improving antioxidant conditions and regulating inducible nitric oxide synthase expression. **Molecules**, New York, v. 16, n. 7, p. 5720-34, jul. 2011.

FUCHS, P. N.; RINGKAMP, M.; SHIOTANI, M.; RAJA, S. N. Sympathectomy decreases formalin-induced nociceptive responses independent of changes in peripheral blood flow. **Experimental Neurology**, Orlando, v. 155, n. 1, p. 95-102, jan. 1999.

GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. **Overview, in Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

GANAPATY, S.; PANNAKAL, S. T.; SRILAKSHMI, G. V. K.; LAKSHMI, P.; WATERMAN, P. G.; BRUN, R. Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 175-178, dec. 2008.

GANAPATY, S.; SRILAKSHMI, G. V.; PANNAKAL, S. T.; RAHMAN, H.; LAATSCH, H.; BRUN, R. Cytotoxic benzil and coumestan derivatives from *Tephrosia calophylla*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 95-99, jan. 2009.

GELEIJNSE, J. M.; LAUNER, L. J.; VAN DER KUIP, D. A. M.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C.M. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 75, n. 5, p. 880-86, may 2002.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Jr.; BORIN, M. F.; RAFAEL, J. A.; JABOR, J. R.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different in vitro methods. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 2, p. 252-257, jan. 2007.

- GLOIRE, G.; LEGRAND-POELS, S.; PIETTE, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 72, n. 11, p. 1493-1505, nov. 2006.
- GOLD, M. S.; REICHLING, D. B.; SHUSTER, M. J.; LEVINE, J. D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 3, p. 1108-1112, feb. 1996.
- GORNAL, A. G.; BARDILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 177, n. 1, p. 751-766, feb. 1949.
- GOTO, K.; OCHI, H.; YASUNAGA, Y.; MATSUYUKI, H.; IMAYOSHI, T.; KUSUHARA, H.; T. OKUMOTO, T. Analgesic effect of mofezolac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, against phenylquinone-induced acute pain in mice, **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, New York, v. 56, n. 4, p. 245-254, jul. 1998.
- GRISWOLD, D. E.; DOUGLAS, S. A.; MARTIN, L. D.; DAVIS, T. G.; DAVIS, L.; AO, Z.; LUTTMANN, M. A.; PULLEN, M.; NAMBI, P.; HAY, D. W.; OHLSTEIN, E. H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 56, n. 4, p. 807-812, oct. 1999.
- GUERRERO, A. T.; VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 84, n. 2, p. 244-251, jun. 2006.
- GUERRERO, A. T.; VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; SILVA, T. A.; SCHIVO, I. R.; DAL-SECCO, D.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 1, p. 122-130, jan. 2008.
- GUIDOT, D. M.; HYBERTSON, B. M.; KITLOWSKI, R. P.; REPINE, J. E. Inhaled NO prevents IL-1-induced neutrophil accumulation and associated acute edema in isolated rat lungs. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 271, n. 2, p. 225-229, aug. 1996.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, dec. 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford, United Kingdom: Clarendon Press, 1999.
- HALLIWELL, B. Antioxidant activity and other biological effects of flavonoids. In: RICE-EVANS, C. **Wake up to flavonoids**. London: Royal Society of Medicine Press, 2000a, p.13-23.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 410-418, aug. 2000b.

HALLIWELL, B. Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurodegeneration that leads to nitritative and oxidative stress and subsequent cell death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 962, n. 1, p. 182-194, may 2002.

HALLIWELL, B.; RAFTER J.; JENNER A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 268S-276S, jan. 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford, New York: Oxford University Press 2007.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 476, n. 2, p. 107-112, aug. 2008.

HANCOCK, C. M.; RIEGGER-KRUGH, C. Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide. **Clinical Journal of Pain**, New York, v. 24, n. 4, p. 353-65, may 2008.

HAZEN, S. L.; HSU, F. F.; MUELLER, D. M.; CROWLEY, J. R.; HEINECKE, J. W. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 98, n. 6, p. 1283-1289, sep. 1996.

HEGAZY, M. E. F.; ABD EL-RAZEK, M. H.; NAGASHIMA, F.; ASAKAWA, Y.; PARÉ, P. W. Rare prenylated flavonoids from *Tephrosia purpurea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n.11, p. 1474-1477, sep. 2009.

HEIDARI, M. R.; FOROUMADI, A.; AMIRABADI, A.; SAMZADEH-KERMANI, A.; AZIMZADEH, B. S.; ESKANDARIZADEH, A. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of a novel rigid 3, 4-dihydroxy chalcone in mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1171, n. 1, p. 399-406, aug. 2009.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 50, n. 2, p. 63-71, feb. 1996.

HIRVONEN, T.; PIETINEN, P.; VIRTANEN, M.; et al. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. **Epidemiology**, Baltimore, v.12, n. 1, p. 62-7, jan. 2001

HOWARD, J. A.; INGOLD, K. U. Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. VI. Alkyl aromatic and olefinic hydrocarbons. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 45, n. 8, p. 793-802, dec. 1967.

HOWARD, J. A. Absolute Rate Constants for Reactions of Oxyl Radicals. In: WILLIAMS, G. H. **Advances in Free Radical Chemistry**. 4. ed. Local: Logos Press, 1972. p. 49-174.

HUANG, H.; CHENG, Z.; SHI, H.; XIN, W.; WANG, T. T.; YU, L. L. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v. 59, n. 9, p. 4562-4569. may 2011.

- IBRAHIM, B.; M'BATCHI, B.; MOUNZEO, H.; BOUROBOU, H. P.; POSSO, P. Effect of *Tephrosia vogelii* and *Justicia extensa* on *Tilapia nilotica* in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 69, n. 2, p. 99-104, feb. 2000.
- IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, I. H.; CHIGOR, V. N.; UZUNUIGBE, O. E.; OYEDEMI, S. O.; ODJADJARE, E. E.; OKOH, A. I.; IGBINOSA, E. O. Polyphenolic Contents and Antioxidant Potential of Stem Bark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 5, p. 2958-2971, may 2011.
- JAIN, S. R.; SHARMA, S. N. Hypoglycaemic drugs of Indian Indigenous Origin. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 15, n. 4, p. 439-442, nov. 1967.
- JANG, D. S.; PARK, E. J.; KANG, Y. H.; HAWTHORNE, M. E. VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; MEHATA, R. G.; PEZZUTTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 66, n. 9, p. 1166-1170, aug. 2003.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease **Toxicology**, New York, v. 283, n. 2, p. 65-87, may 2011.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, New York, v. 413, n. 6852, p. 203-10, sep. 2001.
- KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Barking, v. 50, n. 26, p. 7536-7541, nov. 2002
- 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. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 137, n. 3, p. 295-310, oct. 2002.
- KETSAWATSAKUL, U.; WHITEMAN, M.; HALLIWELL, B. A re-evaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 2, p.692-9, dec. 2000.
- KHALIVULLA, S. I.; REDDY, B. A.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B.; MURTHY, M. M.; RAO, T. P. A new di-O-prenylated isoflavone from *Tephrosia tinctoria*. **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 10, n. 9, p. 953-955, sep. 2008.
- KHAN, N.; SHARMA, S.; ALAM, A.; SALEEM, M.; SULTANA, S. *Tephrosia purpurea* ameliorates N-diethylnitrosamine and potassium bromate-mediated renal oxidative stress and toxicity in Wistar rats. **Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 88, n. 6 p. 294-299, jun. 2001.
- KHASAR, S. G.; GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 256, n. 1, p. 17-20, oct. 1998.
- KHATRI, A.; GARG, A.; AGRAWAL, S. S. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 122, n. 1. p 1-5, feb. 2009.

KLEBANOFF, S. J.; CLARK, R. A. **The Neutrophil: Function and Clinical Disorders**. Amsterdam: North Holland Publishing, 1978.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 69, n. 1, p. 33-42, jan. 2001.

KOLACZKOWSKA, E.; ARNOLD, B.; OPDENAKKER, G. Gelatinase B/MMP-9 as an inflammatory marker enzyme in mouse zymosan peritonitis: comparison of phase-specific and cell-specific production by mast cells, macrophages and neutrophils. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 213, n. 2, p. 109-124, sep. 2008.

KOLACZKOWSKA, E.; GRZYBEK, W.; VAN ROOIJEN, N.; PICCARD, H.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B.; Opdenakker, G. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 85, n. 3, p. 374-381, mar. 2009.

KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; MALO-RANTA, M.; MOILANEN, E. Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 382, n. 2, p. 111-117, oct. 1999.

KUPELI, E.; ORHAN, I.; TOKER, G.; YESILADA, E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 2, p. 169-174, sep. 2006.

LAPOINTE, S. L.; MCKENZIE, C. L.; HUNTER, W. B. Toxicity and repellency of *Tephrosia candida* to larval and adult *Diaprepes root weevil* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 96, n. 3, p. 811-816, jun. 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception, **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 53, n. 4, p. 597-652, dec. 2001.

LEE, D. W.; ANDERSEN, J. K.; KAUR, D. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. **Molecular Interventions**, New York, v. 6, n. 2, p. 89-97, apr. 2006.

LEIRO, J. M.; VARELA, M.; PIAZZON, M. C.; ARRANZ, J. A.; NOYA, M.; LAMAS, J. The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing. **Molecular Immunology**, London, v. 47, n. 5, p. 1114-1120, feb. 2010.

LELAMALY, K.; WANG, W.; GENGARO, P.; EDELSTEIN, C.; SCHRIEIR, R.W. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on endotoxin-induced leukocyte adhesion to the endothelium. **Journal of Cellular Physiology**, Chichester, v. 188, n. 3, p. 337-342, sep. 2001.

LEMONS, H. P.; GRESPAN, R.; VIEIRA, S. M.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; FERNANDES, K. S. S.; SOUTO, F. O.; MCINNES, I. B.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 14, p. 5954-5959, mar. 2009.

- LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 2, p. 454-460, jan. 2009.
- LI, D.Q.; ZHOU, N.; ZHANG, L.; MA, P.; PFLUGFELDER, S. C. Suppressive effects of azithromycin on zymosan-induced production of proinflammatory mediators by human corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, Philadelphia, v. 51, n. 11, p. 5623-5629, jun. 2010.
- LINGNERT, H.; VALENTIN, K.; ERICKSON, C. E. Measurement of antioxidative effect in model system. **Journal of Food Processing and Preservation**, New York, v. 3, n. 2, p. 87-104, apr. 1979.
- LIU, Y.G.; LUO, J. B.; HE, F. Effects of compositions of Mahuang decoction on chemotaxis and leukotriene production from neutrophils in rats. **China Journal of Chinese Materia Medica**. Windsor, v. 30, n. 11, p. 858-60, jun. 2005.
- LODHI, S.; PAWAR, R. S.; JAIN, A. P.; SINGHAI, A. K. Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 108, n. 2, p. 204-210, may 2006.
- BOLLA, M.; MOMI, S.; GRESELE, P.; SOLDATO, P. Nitric oxide-donating aspirin (NCX 4016): an overview of its pharmacological properties and clinical perspectives. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 62, n. 1, p. 145-154, jan. 2006.
- MAGDALENA, L. C.; TAK YEE, A. W. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 48, n. 6, p. 749-762, jan. 2010.
- MAILLARD, B.; INGOLD, K. U.; SCAIANO, J. C. Rate Constants for the Reactions of Free Radicals with Oxygen in Solution. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 105, n. 15, p. 5095-5099, jul. 1983.
- MALMBERG; YAKSH. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 15, n. 4, p. 2768-2776, apr. 1995.
- MARTIN, J. L.; KOODIE, L.; KRISHNAN, A. G.; CHARBONEAU, R.; BARKE, R. A.; ROY, S. Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. **American Journal of Pathology**, New York, v. 176, n. 2, p. 786-99, fev. 2010.
- MARTINEZ, M. C. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77: 147-161, 1995
- MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, aug. 2007.

- MEDVEDEV, A. E.; KOPYDLOWSKI, K. M.; VOGEL, S. N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression, **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, n. 11, p. 5564-5574, jun. 2000.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBUR, T. P.; JANEWAY JR, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, New York, v. 388, n. 6640, p. 394-397, jul. 1997.
- MEIR, S.; KANNER, B.; AKIRI, B.; LORD, J.; NEWMAN, J.; HADAS, S. P. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Barking, v. 43, n. 7, p. 1813-1819, jan. 1995.
- MENG, X.; MUNISHKINA, L. A.; FINK, A. L.; UVERSKY, V. N. Effects of Various Flavonoids on the α -Synuclein Fibrillation Process. **Parkinson's Disease**, New York, v. 650794, n. 1, p. 1-16, jan. 2010.
- MIRA, L.; FERNANDEZ, M. T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORÊNCIO, M. H.; JENNINGS, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radical Research**, London, v. 11, 36, n. p. 1199-208, nov. 2002.
- MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 647, n. 1, p. 103-109, sep. 2010.
- MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORRI, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, Basel, v. 74, n. 6, p. 709-721, dec. 2003.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 225, n. 2, p. 115-121, jan. 2003.
- MUIVA, L. M.; YENESEW, A.; DERESE, S.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G.; AKALA, H. M.; EYASE, F.; WATERS, N. C.; MUTAI, C.; KERIKO, J. M.; WALSH, D. Antiplasmodial β -hydroxydihydrochalcone from seedpods of *Tephrosia elata*. **Phytochemistry Letters**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 99-102, aug. 2009,
- MUKAMAL, K. J.; MACLURE, M.; MULLER, J. E.; SHERWOOD, J. B.; MITTLEMAN, M. A. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. **Circulation**, Dallas, v. 105, n. 1, p. 2474-2479, may 2002.
- MULLIGAN, M. S.; LENTSCH, A. B.; MIYASAKA, M.; WARD, P. A. Cytokine and adhesion molecule requirements for neutrophil recruitment during glycogen-induced peritonitis. **Inflammation Research**, New York, v. 47, n. 6, p. 251-5, jun. 1998.
- NARAYANAN, M. C.; RAO, P. R.; SHANMUGAM, N. N.; GOPALAKRISHNAN, S. M.; DEVI K. Isolation and characterisation of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrid*. **Natural Products Research**, London, v. 21, n. 10, p. 903-909, aug. 2007.

- NETO, V. A.; BOMFIM, R. R.; OLIVEIRA, V. O. B.; PASSOS, A. M. P. R.; OLIVEIRA, J. P. R.; LIMA, C. A.; MENDES, S. S.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. Ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n.6, p. 933-938, nov. 2010
- NIASSY, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H.; ANTON, R.; KONÉ, M. E. Flavonoids from *Tephrosia deflexa* and *T. albifoliolis*. **Biochemical systematics and ecology**, Elmsford , v. 33, n. 1, p. 309-312, nov. 2005.
- NONDO, R. S. O.; MBWAMBO, Z. H.; KIDUKULI, A. W.; INNOCENT, E. M.; MIHALE, M. J.; ERASTO, P.; MOSHI, M. J. Larvicidal, antimicrobial and brine shrimp activities of extracts from *Cissampelos mucronata* and *Tephrosia villosa* from coast region, Tanzania. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, n. 33, p. 1-7, apr. 2011.
- OMS. Situación regulamentaria de los medicamentos: una resena mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, p. 62, 2000.
- OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, New York, v. 245, n. 3, p. 194-205, dec. 2008.
- OZGOVÁ, S.; HERMÁNEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 66, n. 7, p. 1127-37, oct. 2003.
- PAULA-NETO, H. A.; ALVES-FILHO, J. C.; SOUTO, F. O.; SPILLER, F.; AMÊNDOLA, R. S.; FREITAS, A.; CUNHA, F. Q.; BARJA-FIDALGO, C. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. **Shock**, Orlando, v. 35, n. 1, p. 17-27, jan. 2011.
- PAVANA, P.; MANOHARAN, S.; RENJU, G. L.; SETHUPATHY, S. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of *Tephrosia purpurea* leaf extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of environmental biology**, Chicago, v. 28, n. 4, p. 833-837, oct. 2007.
- PAVANA, P.; SETHUPATHY, S.; SANTHA, K.; MANOHARAN, S. Effects of *Tephrosia purpurea* aqueous seed extract on blood glucose and antioxidant enzyme activities in streptozotocin induced diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Durban, v. 6, n. 1, p. 78-86, oct. 2009.
- PEREIRA-DA-SILVA, B.; PAZ-PARENTE, J. Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, n. 1, p. 87-S88, mar. 2002.
- PRADO, W. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.
- PRATT, D. A.; TALLMAN, K. A.; PORTER, N. A. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: new mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 44, n. 6, p. 458-67, jun. 2011

- PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, Barking, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, may 2005.
- QUINTÃO, N. L.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; ROCHA, L. W.; LUCINDA-SILVA, R. M.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M.; CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. Aleurites moluccana (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties of a Standardized Dried Extract and Its Chemical Markers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 179890, n. 1, p. 1-10, mar 2011.
- REDDY, R. V.; KHALIVULLA, S. I.; REDDY, B. A.; REDDY, M. V.; GUNASEKAR, D.; DEVILLE, A.; BODO, B. Flavonoids from *Tephrosia calophylla*. **Natural Product Communications**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 59-62, jan. 2009.
- RIBEIRO, W. H.; VASCONCELOS, J. N.; ARRIAGA, A. M.; OLIVEIRA, M. C.; ANDRADE-NETO, M.; LEMOS, T. L.; SANTIAGO, G. M.; NASCIMENTO, R. F.; MAFEZOLI, J. *Tephrosia toxicaria* pers essential oil: chemical composition and larvicidal activity. **Natural Products Communications**, local, v. 1, n. 1, p. 391-394, jan. 2006.
- RIZZA, S.; MUNIYAPPA, R.; IANTORNO, M.; KIM, J. A.; CHEN, H.; PULLIKOTIL, P.; SENESE, N.; TESAURO, M.; LAURO, D.; CARDILLO, C.; QUON, M. J. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, London, v. 96, n. 5, p. E782-92, may 2011.
- ROACH, J. C.; SMITH, K. D.; STROBE, K. L.; NISSEN, S. M.; HAUDENSCHILD, C. D.; ZHOU, D.; VASICEK, J. T.; HELD, G. A.; STOLOVITZKY, G. A.; HOOD, L. E.; ADEREM, A. Transcription factor expression in lipopolysaccharide-activated peripheral-blood-derived mononuclear cells, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 41, p. 16245-16250, oct. 2007.
- RODRICK, M. L.; LAMSTER, I. B.; SONIS, S. T.; PENDER, S. G.; KOLODKIN, A. B.; FITZGERALD, J. E.; WILSON, R. E. Effects of supernatants of polymorphonuclear neutrophils recruited by different inflammatory substances on mitogen responses of lymphocytes. **Inflammation**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-11, mar. 1982.
- RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; PIGOSO, A. A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, A. S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis-potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 136, n.1, p. 136-142, may 2002.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 2, p. 235-254, sep. 2005.
- SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/ cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n.10, p. 3680-3685, marc. 2004.

- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 115, n. 7, 1265-1275, aug. 1995.
- SALEEM, M.; AHMED, S. U.; ALAM, A.; SULTANA, S. *Tephrosia purpurea* alleviates phorbol ester-induced tumor promotion response in murine skin. **Pharmacological Research**, London, v. 43, n. 2, p. 135-144, feb. 2001.
- SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n.1, p. 133-139, mar. 2005.
- SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 89, n. 2, 707-758, apr. 2009.
- SANNIGRAHI, S.; MAZUMDER, U. K.; PAL, D.; MISHRA, M. L.; MAITY, S. Flavonoids of *enhydra fluctuans* exhibits analgesic and anti-inflammatory activity in different animal models. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, Karachi, v. 24, n. 3, p. 369-375, jul. 2011.
- SARIN, J. P. S.; SINGH, S.; GARG, H.; KHANNA, N. M.; DHAR, M. M. A flavonol glycoside with anticancer activity from *Tephrosia candida*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 232-234, 1976.
- SATO, M.; SANO, H.; IWAKI, D.; KUDO, K.; KONISHI, M.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, T.; IMAIZUMI, H.; ASAI, Y.; KUROKI, Y. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 1, p. 417-425, jul. 2003.
- SCHEINMAN, R. I.; COGSWELL, P. C.; LOFQUIST, A. K.; BALDWIN Jr, A. S. Role of transcriptional activation of Ikb α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, London, 270, n. 5234, p. 283 -286, oct. 1995.
- SESSO, H. D.; GAZIANO, M.; BURING, J. E.; HENNEKENS, C. H. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.149, n. 2, p. 162-167, jan. 1999.
- SHENOY, S.; SHWETHA, K.; PRABHU, K.; MARADI, R.; BAIRY, K. L.; SHANBHAG, T. Evaluation of antiinflammatory activity of *Tephrosia purpurea* in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Nagoya, v. 3, n. 3, p. 193-195, mar. 2010.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, **Pain**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 347-352, sep. 1989.
- SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROCO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, London, v. 36, n. 11, p. 1219-1227, nov. 2002.
- SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, Amsterdam, v. 897, n. 1, p. 9-19, apr. 2001.

SOUTO, F. O.; ZARPELON, A. C.; FERRARI, L. S.; FATTORI, V.; CASAGRANDE, R.; FONSECA, M. J. V.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W.A. Jr. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB₄, and fMLP: Inhibition of Actin Polymerization. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 74, n. 2, p. 113-118, jan. 2011.

TRESCOT, A. M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, Paducah, v. 11, n. 2, p. 133-153, mar. 2008.

TSAI, K. L.; HUANG, Y. H.; KAO, C. L.; YANG, D. M.; LEE, H. C.; CHOU, H. Y.; CHEN, Y. C.; CHIOU, G. Y.; CHEN, L. H.; YANG, Y. P.; CHIU, T. H.; TSAI, C. S.; OU, H. C.; CHIOU, S. H. A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, DOI: 10.1016/j.jnutbio.2011.01.011, jun. 2011.

TSAO, P. S.; BUITRAGO, R.; CHAN, J. R.; COOKE, J.P. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. **Circulation**, Dallas, v. 94, n. 7, p. 1682-1689, oct. 1996.

TSUJI, R. F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N. M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical & Experimental Allergy**, New York, v. 33, n. 2, p. 249-58, feb. 2003.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Archiv**, Berlin, v. 459, n. 6, p. 923-939, may 2010.

VALÉRIO, D. A.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; DA COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W.A. Jr. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 562, n.1, p. 155-163, feb. 2007.

VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T. M.; VICENTINI, F. T.; VIEIRA, S. M.; FONSECA, M. J.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Jr. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 72, n. 11, p. 1975-1979, nov. 2009a.

VALÉRIO, D. A.; FERREIRA, F. I.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; LIMA, F. O.; DE OLIVEIRA, J. R.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; QUEIROZ, R. H.; VERRI, W. A. Jr. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 158, n. 2, p. 558-568, jul. 2009b.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, New York, v. 39, n. 1, p. 44-84, aug. 2007.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 97-120, jan. 1998.

VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; ANDRADE NETO, M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; Santiago, G.M.P.;

VERRI, W.A. Jr.; MOLINA, R. O.; SCHIVO, I. R.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 315, n. 2, p. 609-615, jul. 2005.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; WEI, X. Q.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-15 mediates immune inflammatory hypernociception by triggering a sequential release of IFN-gamma, endothelin, and prostaglandin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 25, p. 9721-9725, jun. 2006a.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive Role of Cytokines and Chemokines: Target for Analgesic Drug Development? **Pharmacology and Therapeutics**, New York, v. 112, n. 1, p. 116-138, oct. 2006b.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; LEUNG, B. P.; MCINNES, I. B.; FRASER, A.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. Role of IL-15 in antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 37, n. 12, p. 3373-3380, dec. 2007a.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Cytokine inhibitors and pain control. **Revista Brasileira Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p. 341-353, sep. 2007b.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M.; MAGRO, D. A.; DOMINGUES, A. C.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, G. R.; LIEW, F. Y.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 588, n. 2, p. 207-212, jul. 2008a.

VERRI, W. A. Jr.; GUERRERO, A. T.; FUKADA, S. Y.; VALERIO, D. A. CUNHA, T. M.; XU, D.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 105, n. 7, p. 2723-2728, fev. 2008b.

VERRI, W. A. Jr.; SOUTO, F. O.; VIEIRA, S. M.; ALMEIDA, S. C. L.; FUKADA, S. Y.; XU, D.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; GUERRERO, A. T. G.; MATTOS-GUIMARAES, R. B.; OLIVEIRA, F. R.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, J. S.; MCINNES, I. B.; FERREIRA, S. H.; LOUZADA, P. Jr.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 69, n. 9, p. 1697-1703, may 2010.

VICENTINI, F. T. M. C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M. J. V.; VERRI, W. A. Jr.; FISHER, G.J.; XU, Y. Quercetin Inhibits UV Irradiation-Induced Inflammatory Cytokine Production in Primary Human Keratinocytes by Suppressing NF-kB Pathway. **Journal of Dermatological Science**, Malden, v. 61, n. 3, p. 162-168, jan. 2011.

- VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R.; NAPIMOGA, M. H.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; SOUZA, D. A. Jr.; JAMUR, M. C.; FERNANDES, K. S.; OLIVER, C.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 158, n.3, p. 779-789, oct. 2009.
- VIJAYAN, S.; GURUPRASAD, L.; KIRTI, P. B. Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 6, p. 1023-1032, oct. 2008.
- VISAVADIYA, N. P.; SONI, B.; SONI, B.; MADAMWAR, D. Suppression of reactive oxygen species and nitric oxide by *Asparagus racemosus* root extract using in vitro studies. **Cellular and molecular biology** (Noisy-le-grand), France, v. 25, n. 55, p. 83-95, feb. 2009.
- WANG, J.; BARKE, R. A.; CHARBONEAU, R.; ROY, S. Morphine impairs host innate immune response and increases susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* lung infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 1, p. 426-34, jan. 2005.
- WEISS, S. J.; LAMPERT, M. B.; TEST, S. T. Long-lived oxidants generated by human neutrophils. Characterization and bioactivity. **Science**, London, v. 222, n. 4624, p. 625-628, nov. 1983.
- WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 320, n. 6, p. 365-376, feb. 1989.
- WEST, A. P.; BRODSKY, I. E.; RAHNER, C.; WOO, D. K.; BROMAGE, H. E.; TEMPST, P.; WALSH, M. C.; CHOI, Y.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, New York, v. 472, n. 7344, p. 476-48, apr. 2011.
- WILLIS, W. D.; COGGESHALL, R. E. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. New York: Plenum, 1991.
- WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Berlin, v. 11, n. 1, p. 215-20, jan. 1996.
- WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 121, n. 3, p. 417-24, jun. 1997.
- WOOLFRE, H. G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 300-307, marc. 1944.
- WORDLICZEK, J.; SZCZEPANIK, A. M.; BANACH, M.; TURCHAN, J.; ZEMBALA, M.; SIEDLAR, M.; PRZEWLOCKI, W.; PRZEWLOCKA, B. The effect of pentoxifiline on post-injury hyperalgesia in rats and postoperative pain in patients. **Life Science**, Basel, v. 66, n. 12, 1155-1164, feb. 2000.

XU, J.; RONG, S.; XIE, B.; SUN, Z.; DENG, Q.; BAO, W.; WANG, D.; YAO, P.; HUANG, F.; LIU, L. Changes in the nitric oxide system contribute to effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. **Rejuvenation Research**, New York, v. 14, n. 1, p. 33-43, feb. 2011.

YENESEW, A.; KIPLAGAT, J. T.; DERESE, S.; MIDIWO, J. O.; KABARU, J. M.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Two unusual rotenoid derivatives, 7a-O-methyl-12a-hydroxydeguelol and spiro-13-homo-13-oxaelliptone, from the seeds of *Derris trifoliata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 10, p. 988-991, may 2006.

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 149, n. 10, p. 943-949, may 1999

YOU DIM, K. A.; DOBBIE, M. S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A. R.; ABBOTT, N. J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. **Journal of Neurochemistry**, New York, v. 85, n. 1, p. 180-192, apr. 2003.

ZHEN, J.; LU, H.; WANG, X. Q.; VAZIRI, N. D.; ZHOU, X. J. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. **American journal of hypertension**, New York, v. 21, n. 1, p. 28-34, jan 2008.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 93-100, mar. 1992.