RICARDO JOSE DUNDER

ESTUDO DO ALCALÓIDE INDIGO NA TERAPÊUTICA DA DOR E INFLAMAÇÃO

CAMPINAS
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

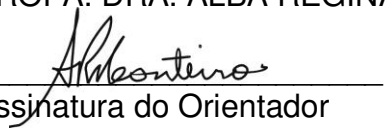
RICARDO JOSE DUNDER

ESTUDO DO ALCALÓIDE INDIGO NA TERAPÊUTICA DA DOR E INFLAMAÇÃO

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
RICARDO JOSÉ DUNDER, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO



Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D915e

Dunder, Ricardo Jose, 1982-
Estudo do alcaloide índigo na terapêutica da dor e inflamação / Ricardo Jose Dunder. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Alba Regina Monteiro Souza Brito.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Índigo. 2. Plantas medicinais. 3. Inflamação. 4. Dor. I. Brito, Alba Regina Monteiro Souza,1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of indigo alkaloid on therapeutic of pain and inflammation
Palavras-chave em inglês:
Indigo
Medicinal plants
Inflammation
Pain
Área de concentração: Farmacologia
Titulação: Doutor em Farmacologia
Banca examinadora:
Alba Regina Monteiro Souza Brito [Orientador]
Sisi Marcondes Paschoal
Edson Rosa Pimentel
Adair Roberto Soares dos Santos
Stella Regina Zamuner
Data de defesa: 30-07-2013
Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RICARDO JOSE DUNDER

ORIENTADORA: PROF. DR. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO

MEMBROS:

1. **PROF. DR. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO** _____
2. **PROF. DR. SISI MARCONDES PASCHOAL** _____
3. **PROF. DR. EDSON ROSA PIMENTEL** _____
4. **PROF. DR. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS** _____
5. **PROF. DR. STELLA REGINA ZAMUNER** _____

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30 de julho de 2013

Dedicatória

Durante o período em que foi realizado esse trabalho não houve melhor ideia do que copiar o Dr. Barbastefano, V. (2007) e dedicar esse trabalho aos meus pais José Carlos Dunder e Maria Araujo da Silva Dunder, eternos heróis.

Agradecimentos

Novamente, uma jornada chega à sua conclusão e não posso deixar de agradecer aqueles que apoiaram e estiveram ao meu lado. Desta forma, nada mais justo do que começar agradecendo a Profa Alba Regina Monteiro Souza Brito pelo voto de confiança para executar o trabalho, além da amizade, conversa e apoio durante período de doutorado;

Agradeço também aos meus amigos de laboratório e irmãos de jornada Aninha, Chris, Dersinho (o pai do Arthur), Eduardo (Cinza), Felipe (capeta em forma de guri), Luis Paulo, Pati (mãe do Arthur) e ao Tomás, pelo apoio nas bancada, conversas e brincadeiras do dia a dia, que fizeram deste trabalho algo prazeroso e enriquecedor; todos vocês são fantásticos.

Mais uma vez, agradeço aos meus pais José Carlos e Maria por SEMPRE terem me dado todo apoio e me instruído e orientado na hora em que precisei; como foi dito na dissertação de mestrado, eles me passaram valores como honra e hombridade, que, creio eu seja esse o principal legado. Agradeço aos meus irmãos Karen, Karla e Marcus pelas risadas, brigas, discussões, além das outras coisas que só os irmãos podem dar, mas que são raras por serem únicas e por isso nos fazem felizes.

À minha namorada Sarah por estar ao meu lado, me apoiar e acalmar, além de me compreender nos momentos de estresse e de dúvida, e também por sorrir e me alegrar nos momentos em que estamos juntos; espero sempre fazer jus a isso, te amo.

Meu muito obrigado ao professor Edson Antunes e sua equipe, Glaucia, Letícia, Celso pelo apoio e parceria que certamente ajudaram a tornar a tese muito mais rica e elegante.

Agradeço aos professores José Marcos Salvador, Carlos Amílcar Parada e Sisi Marcondes pelas sugestões na banca de qualificação.

Aos amigos Ivan, Fipo, Juliana, Maria e André pelo apoio em alguns experimentos e ajuda nas técnicas de biologia molecular, além das conversas e brincadeiras durante o período.

Ao Prof Paulo Pinto Joazeiro, Sílvio Consonni e Stephanie Federighi que enriqueceram o trabalho com seu conhecimento na área de histologia, além da amizade e apoio.

À Profa Clélia Akiko Hiruma Lima e à sua equipe pela disponibilidade, conhecimento e colaboração que são inestimáveis.

Aos professores Edson Rosa Pimentel, Stella Regina Zamuner, Adair Roberto Soares, Claudio Chysostomo Werneck e Ana Beatriz Albino de Almeida por participarem do final dessa jornada.

Ao Lazinho pelas conversas e pelo profissionalismo, além do auxílio no laboratório.

Agradeço à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo- ***FAPESP,*** *pelo suporte financeiro e ao CEMIB/UNICAMP pelos ratos wistars e camundongos swiss, sem os quais o trabalho não poderia ser executado.*

E por fim, agradeço a Deus por permitir que esteja vivo hoje para defender minha tese depois de um choque anafilático e quase ter passado para o outro lado.

Enfim, a todos meu humilde MUITO OBRIGADO.

Epígrafe

"O Mundo Continua o Mesmo, mas Há Muito Menos Dele"

(Frase de Jack Sparrow, personagem de Johnny Depp,

em Piratas do Caribe no Fim do Mundo)

Sumário

Lista de Abreviaturas ____ xvii

Lista de Figuras e Tabelas ____ xxi

Resumo ____ xxv

Abstract ____ XXVII

1. **Introdução** ____ 29

1.1. **Processo Inflamatório** ____ 29

1.2. **Dor** ____ 34

1.3. **Terapia da Inflamação e da Dor** ____ 36

1.4. **Atividade Terapêutica das Plantas** ____ 40

1.5. **Alcaloides** ____ 41

1.6. **Gênero *Indigofera* e o Índigo** ____ 42

2. **Justificativa** ____ 45

2.1. **Objetivos** ____ 45

3. **Materiais e Métodos** ____ 47

3.1. **Drogas Utilizadas** ____ 47

3.2. **Coleta da Planta** ____ 47

3.3. **Extração e Isolamento do Índigo** ____ 47

3.4. **Animais** ____ 48

3.5. **Grupos Experimentais** ____ 49

3.6. **Testes Farmacológicos – Modelos de Inflamação** ____ 50

3.6.1. **Modelo de Edema de Orelha Induzido por Xilol** ____ 50

3.6.2. **Modelo de Edema de Orelha Induzido por Ácido Araquidônico** ____ 50

3.6.3. **Edema de Pata Induzido por Carragenina** ____ 51

3.6.4. **Granuloma *Cotton Pellet*** ____ 52

3.6.5. **Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina** ____ 52

3.7. Estudo da Ação do Índigo nos Mediadores Inflamatórios 53

3.7.1. Dosagem de MPO no Lavado Pleural 53

3.7.2. Dosagem de Nitrito e Nitrato em Lavado Pleural 54

3.7.3. Dosagem de PGE2 em Lavado Pleural 54

3.7.4. Dosagem de TNF-α em Lavado Pleural 55

3.7.5. Preparo do Extrato Citosólico e Nuclear 55

3.7.6. Western Blotting (NF-κB, COX-1 e COX-2) 56

3.8. Modelos de Indução de Dor 58

3.8.1. Teste de Randall-Sellito 58

3.8.2. Análise Histológica da Pata de Ratos 58

3.8.3. Análise Imuno-histoquímica da Pata de Ratos 59

3.8.4. Modelo de Contorção Abdominal por Injeção de Ácido Acético 59

3.8.5. Modelo de *Tail Flick* 60

3.8.6. Modelo de Placa Quente 60

3.8.7. Teste de Formalina 61

3.8.8. Teste de Formalina com Reversão por Naloxona 62

3.8.9. Teste de Capsaicina 62

3.9. Análise Estatística 63

4. Resultados 65

4.1. Ensaios com Atividade Anti-Inflamatória 65

4.1.1. Edema de Orelha Induzido por Xilol 65

4.1.2. Edema de Orelha com Ácido Araquidônico (AA) 66

4.1.3. Edema de Pata Induzido por Carragenina 67

4.1.4. Análise de Western Blot para COX-2 68

4.1.5. Análise de Western Blot para COX-1 69

4.1.6. Análise de Western Blot para NF-κ B (p65) 70

4.1.7. Granuloma *Cotton Pellet* 71

4.1.8. Pleurisia Induzida por Carragenina 72

4.2. Estudo da Ação do Índigo nos Mediadores Inflamatórios 74

4.2.1. Dosagem de MPO Através de Ensaio Colorimétrico 74

4.2.2. Dosagem de Nitrito e Nitrato pelo Método de Griess 75

4.2.3. Dosagem de TNF- α Através de Teste de ELISA 76

4.2.4. Dosagem de PGE2 Através de Teste de ELISA 77

4.2.5. Expressão da COX-2 por Análise por Western Blot 78

4.3. Ensaios com Atividade Analgésica 79

4.3.1. Teste de Randall – Selitto 79

4.3.2. Histologia da Pata de Ratos 80

4.3.3. Análise Imunohistoquímica da Pata de Ratos 82

4.3.4. Contorções Abdominais 86

4.3.5. Teste de Tail Flick 86

4.3.6. Modelo de Placa Quente 88

4.3.7. Teste de Formalina 89

4.3.8. Teste de Formalina com Reversão por Naloxona 90

4.3.9. Teste de Capsaicina 91

5. Discussão 93

6. Conclusões 109

7. Perspectivas 111

Referências Bibliográficas 113

Anexos 125

Lista de Abreviaturas

- AA= Ácido Araquidônico
- AAS= Ácido Acetil Salicílico
- AMPc= Adenosina Monofosfato Cíclica
- ATP= Adenosina Tri Fosfato
- CC= Cromatografia em coluna
- CCDC= Cromatografia em camada delgada comparativa
- CLAE= Cromatografia líquida de alta eficiência
- CEEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal
- CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
- COBEA= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX-1= Ciclo-oxigenase – 1 (constitutiva)
- COX-2= Ciclo-oxigenase – 2 (indutiva)
- COXIBS= Inibidores Seletivos da COX
- CPG= Cromatografia de permeação em gel
- DAINES= Drogas Anti-inflamatórias Não Esteroidais
- DEXA= Dexametasona
- EMP= Efeito Máximo Possível
- EOSI= Eosinófilos
- EP = Receptor Prostanóide
- FOA_2= Fosfolipase A_2
- GC= Glicocorticoides
- GC-FID= Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
- GR= Receptor de Glicocorticoides
- GRE= Elementos de Resposta aos Glicocorticoides
- HE= Hematoxilina Eosina
- HTAB= Brometo de Hexadecil-Trimetil-Amonium
- IASP= Associação Internacional para Estudos da Dor
- IFN-γ = Interferon γ
- IgE = Imunoglobulina E

- IL1β= Interleucina 1β
- IL-4 = Interleucina - 4
- IL-6= Interleucina - 6
- IL-8= Interleucina - 8
- IL-10= Interleucina – 10
- IL-12= Interleucina - 12
- IL-17= Interleucina - 17
- IL-22= Interleucina - 22
- INDO= Indometacina
- iNOS= Óxido Nítrico Sintetase
- IκB = Subunidade Inibidora κB
- i.p= Intra-peritoneal
- 5-LOX= Lipoxigenase 5
- 15-LOX = Lipoxigenase 15
- LPS= Lipopolisacarídeos
- LT= Leucotrienos
- MAST= Mastócitos
- MCP-1 = Proteína Quimiotáxica de Monócitos
- MONO= Mononucleares
- MPK= Proteína Quinase Mitógeno Ativada
- MPO= Mieloperoxidase
- NEUTR= Neutrófilos
- NF-κB= Fator Nuclear Kappa B
- NO= Óxido Nítrico
- OMS= Organização Mundial de Saúde
- PAF = Fator Ativador de Plaquetas
- PBS= Tampão Salina Fosfato
- PGE_2= Prostaglandina E_2
- PPD= Pata Posterior Direita
- PPE= Pata Posterior Esquerda
- RMN= Ressonância magnética nuclear

- SNC= Sistema Nervoso Central
- SSF= Solução Salina Fisiológica
- TLR4 = Toll Like Receptor
- TNF-α= Fator de Necrose Tumoral α
- TRP's = Receptores de Potencial Transitório
- TRPV1= Receptores de Potencial Transitório de Vanilina
- v.o.= Via Oral

❖

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 Avaliação antiedematogênica do alcaloide índigo (doses 1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) no edema de orelha induzido por xilol em camundongos (n=8). Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguido por teste de Tukey *** p< 0.001 em comparação ao grupo Veículo. 65

Figura 2 Efeito antiedematogênico do índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) e controle positivo indometacina (5.0 mg/kg) em modelo de edema de orelha por AA em camundongos (n= 8) . Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey, *** p< 0.001, em comparação a formação de edema do grupo controle negativo Veículo..... 66

Figura 3 Efeito anti-inflamatório do alcaloide índigo em edema de pata de ratos (n= 5) induzido por carragenina, medições realizadas após ½ , 1, 2,3 e 4 h. Valores apresentados em média ± d.p do volume de água deslocado em ml. ANOVA seguido pelo teste de Tukey, **p<0.001 em comparação ao grupo Veículo. 67

Figura 4 Efeito do índigo sobre a expressão da COX-2, através da orelha dos camundongos obtida pelo edema de orelha induzido por AA. Valores apresentados em Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * p< 0,05, ** p<0.01 *** p< 0.001, em comparação ao grupo Veículo..... 68

Figura 5 Efeito do índigo sobre a expressão de COX-1 através da técnica de western blot. Valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * p< 0.05..... 69

Figura 6 Efeito do índigo sobre a expressão da subunidade p65 do NF- κB através de western blot. Valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica e expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * p< 0.05, ** p< 0.01 e *** p<0.001..... 70

Figura 7 Inibição do infiltrado celular pelo índigo através do modelo de pleurisia induzido por carragenina. Valores apresentados em média ± d.p do total de células infiltradas na cavidade pleural em comparação ao grupo Veículo (exceto grupo Sham valores basais). ANOVA seguido de Tukey *** p< 0.001..... 72

Figura 8 Avaliação dos níveis de MPO em lavado pleural (n=7) nos grupos tratados com Veículo, DEXA e índigo nas doses de 1.5; 3.0 e 6.0 mg/kg. * p< 0.05 e ***p< 0.001. Valores expressos em média ± d.p; Teste de ANOVA seguido por Tukey. 74

Figura 9 Estudo dos níveis de nitrato pelo método de Griess em lavado pleural coletado 4 horas após inflamação (n=7). Valores significativos ***p< 0.01 em comparação ao grupo Veículo, valores expressos em média ± d.p. Teste de ANOVA seguido por Tukey. 75

Figura 10 Efeito do índigo e controle positivo dexametasona sobre o TNF-α em lavado pleural (n=7), valores expressos em média ± d.p em comparação ao grupo Veículo. **p< 0.01 e *** p< 0.001, Teste de ANOVA seguido por Tukey. 76

Figura 11 Efeito do índigo e controle positivo dexametasona sobre os níveis de PGE_2 em lavado pleural (n=7). Valores expressos em média ± d.p ** p< 0.01 e ***p< 0.001. Teste de ANOVA seguido por Tukey em comparação ao grupo Veículo. 77

Figura 12 Avaliação da expressão de COX-2 por western blot em lavado pleural. valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * p< 0,05 *** p< 0,001. 78

Figura 13 Fotomicrografias de cortes transversais de patas de rato tratados com veículo (A), veículo + carragenina (B), INDO (C), e morfina (D). Note em A a ausência de infiltrado de granulócitos e mononucleares na derme, enquanto em B observa-se presença de edema (asterisco) e infiltrado (seta) na derme. Em C não aparece infiltrado celular (granulócitos e mononucleares) e nem edema. No tratamento com morfina em D, note a presença de grande quantidade de infiltrado (seta) e edema (asterisco) na derme. Coloração H&E. Barras: = 200x. 80

Figura 14 . E, F e G são fotomicrografias de cortes transversais de patas de rato tratados com 1.5 mg/kg (E), 3.0 mg/kg (F), 6.0 mg/kg indo (G) de índigo. Note em E a presença de infiltrado de granulócitos e mononucleares (seta) na derme. Já em F e G, observe a redu a redução do infiltrado celular e do edema na derme. Coloração H&E. Barras: = 200x. 81

Figura 15 Fotomicrografias de imuno-histoquímica para COX-2 de cortes transversais de patas de rato tratados com veículo (A e B), veículo + carragenina (C e D), indo (E e F), e morfina (G e H). Identificações na figura: Seta preta indica reação positiva em vasos sanguíneos presentes na derme; seta vermelha indica reação positiva predominante no citoplasma de células residentes do tecido conjuntivo; asterisco vermelho indica reação positiva para COX-2. Imuno-histoquímica para COX-2 com contra-coloração de hematoxilina de Harris. Barras: A, C, E, G = 100x; B, D, F, H = 200x. 84

Figura 16 Fotomicrografias de imuno-histoquímica para COX-2 de cortes transversais de patas de rato tratados com 1.5 mg/kg (A e B), 3.0 mg/kg (C e D) e 6.0 mg/kg (E e F) de índigo. Note em A e B a reação positiva para COX-2, tanto em vasos sanguíneos (seta preta), quanto no compartimento extracelular (asterisco vermelho). Observe em C-F a marcação para COX-2 predominante em vasos sanguíneos (seta preta). Note ainda ausência de imuno-reação nos controles negativos, nos quais o anticorpo primário foi substituído por soro de mesma espécie que o anticorpo secundário. Imuno-histoquímica para COX-2 com contra-coloração de hematoxilina de Harris. Barras: A, C, E = 100x; B, D, F = 200x. 85

Figura 17 Efeito antinociceptivo do índigo e controle positivo indometacina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (n=8). Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguido por teste de Tukey *** p< 0.001 em comparação ao grupo Veículo. 86

Figura 18 Efeito antinociceptivo do Índigo durante o teste de tail flick. Valores apresentados como média do tempo de latência para que o animal retire a cauda da fonte de calor. ANOVA seguida pelo teste de Tukey, **p< 0.001..... 87

Figura 19 Efeito do índigo sobre a fase neurogênica do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey *** p< 0.001..... 89

Figura 20 Ações do índigo sobre a fase inflamatória do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey, **p< 0.01 e *** p< 0.001..... 89

Figura 21 Efeito do índigo sobre a fase neurogênica do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey *** p< 0.001. # diferença significativa com a Morfina + Naloxona p<0.05. 90

Figura 22 Efeito do índigo sobre a fase inflamatória do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey** p<0.01 e *** p< 0.001; $^{\#}$p<0.05. 90

Figura 23 Efeitos do tratamento com índigo sobre a dor neurogênica no modelo de dor induzida por capsaicina. Valores expressos em media e d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey p< 0.01 e *** p< 0.001..... 91

Figura 24 Inibição do infiltrado celular pelo índigo através do modelo de asma sensibilizado por OVA . Valores apresentados em média e d.p do total de células infiltradas na cavidade pleural. *p< 0.05, ** p< 0.01 e, ANOVA seguido de Tukey..... 126

Figura 25 Redução da infiltração de eosinófilos no modelo de asma induzido por ovoalbulmina pela ação do índigo e o controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p. Teste de ANOVA seguido de Tukey..... 127

Figura 26 Redução da infiltração de neutrófilos na contagem diferencial de células no lavado bronco alveolar em modelo de asma sensibilizado por OVA pela ação do índigo e controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p de Neutrófilos/mL (10^6), *** p< 0,01 Teste de ANOVA seguido de Tukey. 127

Figura 27 Redução da infiltração de mononucleares na contagem diferencial de células no modelo de asma sensibilizado por OVA pela ação do índigo e controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p de Neutrófilos/mL. * p< 0.05, Teste de ANOVA seguido de Tukey 128

Tabela 1 Grupos tratados durante o trabalho..... 49

Tabela 2 Avaliação da infiltração celular no modelo granuloma *cotton pellet*. Valores expressos em média ± d.p. ANOVA seguido pelo teste de Tukey *** p<0.001 em comparação ao grupo Veículo. 71

Tabela 3 Contagem diferencial de leucócitos. Valores apresentados como média e d.p, comparados ao grupo Veículo. ANOVA Seguido de Tukey. ** p< 0.01 e *** p< 0.001.. 73

Tabela 4. Aumento do limiar de dor induzido pelo índigo e pelos controles positivos indometacina e morfina no modelo de Randall e Selitto. ANOVA seguido de Tukey, * p<0.05 e ** p<0.001 comparando os grupos tratados com o Veículo. # p<0.01 comparação dos grupos com o seu valor basal. 79

Tabela 5 Aumento da Latência causado pelo índigo no modelo de Tail flick durante as horas de observação. Valores expressos em % Efeito Máximo Possível (EMP). 87

Tabela 6 Valores dos tempos de latência causados pelo índigo no modelo de placa quente. Valores expressos por média e desvio padrão Teste de ANOVA seguido de Tukey, *p<0.05; **p<0.01. Em comparação ao grupo Veículo. 88

Fluxograma 1 Processo de obtenção do alcaloide índigo a partir das partes aéreas de *Indigofera truxilensis* (Kunth) CC (Cromatografia em coluna),CCDC (Cromatografia em camada delgada comparativa), CPG (Cromatografia de permeação em gel), GC-FID (Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama), RMN (Ressonância magnética nuclear). 48

Fluxograma 2 Esquema resumido da atividade do índigo durante o trabalho. Seta azul clara indução, seta vermelha redução observada nos tratamentos com índigo e seta azul escura possível ação do índigo. 109

Ilustração 1 *Indigofera truxilensis* (Kunth) (Maíra Cola, 2006). 43

Ilustração 2 Molécula do alcaloide Bis-indolico índigo 43

Resumo

A inflamação é uma resposta do sistema imune a patógenos ou a traumas físicos e químicos; sua evolução pode resultar em resolução dos danos ou tornar-se crônica. Como tal, trata-se de um fenômeno complexo envolvendo inúmeros mediadores como o NF-κB, que promove a liberação de citocinas e enzimas pró-inflamatórias seguidas por uma infiltração de leucócitos, resultando nos cinco sinais cardinais: calor, rubor, tumor (edema), dor e perda de função. A aplicação de metabólitos secundários de plantas é uma alternativa para o tratamento da dor e inflamação. Dentre estes metabólitos, os alcaloides recebem especial atenção já que a morfina é o mais potente analgésico conhecido. Neste trabalho o potencial anti-inflamatório e analgésico de outro alcaloide, o índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg), obtido a partir de *Indigofera truxillensis* (*Leguminosae*), foi analisado em modelos de edema (de orelha induzido por xilol e ácido araquidônico, e de pata induzido por carragenina) e de migração celular (granuloma *cotton pellet* e pleurisia). Nesses modelos, o índigo apresentou redução significativa do edema e do infiltrado celular, principalmente de polimorfonucleares. Análises por ELISA (em lavado pleural) revelaram que o alcaloide diminuiu os níveis de MPO, nitrito e nitrato, PGE_2 e TNF-α, além de apresentar redução significativa na expressão da COX-2 avaliadas por western blot e imuno-histoquímica. A redução dos mediadores sugere que o índigo possa ter ação anti-inflamatória envolvendo NF-κB, já que tal atividade foi confirmada por western blot. Nos modelos de dor inflamatória (teste de Randall & Selitto, contorções abdominais e formalina) o alcaloide novamente demonstrou resposta significativa, muito provavelmente por reduzir os mediadores inflamatórios envolvidos. O índigo aumentou a latência em modelos de dor induzido por estímulo térmico (tail flick e placa quente) e capsaicina, ambos envolvidos com atividade do TRPV1, mas não demonstrou interação alguma com receptores opioides no modelo de formalina com reversão por naloxona. Os resultados sugerem que o índigo possui ação anti-inflamatória devido um possível mecanismo de ação COX-2 e NF-κB. É provável que a redução desses mediadores contribua para ação analgésica na dor inflamatória e também para redução da dor periférica.

Abstract

The inflammation is an immune system response to pathogens, chemical or physical traumas; this evolution may result in damage, or become chronic. It is a complex phenomenon, which involves several mediators, such as NF-κB that promotes the release of cytokines and pro-inflammatory enzymes followed by leukocyte infiltration; resulting in five cardinal signs: heat, redness, tumour, pain and loss of function. The application of secondary metabolites of plants is an alternative for treatment of pain and inflammation. Among the metabolites, the alkaloids receive special emphasis such as morphine, a potent analgesic. In this work, the anti-inflammatory and analgesic potential of indigo alkaloid (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg), obtained from *Indigofera truxillensis* (*Leguminosae*) was observed in edema models (xylene and arachidonic acid ear edema and carrageenan hind paw) and cellular infiltration (granuloma *cotton pellet* e pleurisy). In these models, indigo presented significant reduction of edema and cellular infiltration, mainly polimorphonuclears. ELISA analyses revealed that alkaloid decreased the levels of MPO, nitrite and nitrate, PGE_2 and TNF-α, as well as the expression of COX-2 by western blot and immunohistochemistry. The reduction of mediators suggests that indigo could have anti-inflammatory an action that involves NF-κB, this activity was seen again by western blot. Randall & Selitto, abdominal writhing and formalin models of inflammatory pain were also performed and the alkaloid, over again, showed significant statistic response, probably by the reduction of inflammatory mediators. Indigo was also evaluated in neurogenic models of pain and demonstrated an increase of the latency in thermal stimuli (tail flick and hot plate tests) and capsaicin tests implicated with TRPV1 activity, however, the alkaloid did not show any interaction with opioid receptors in the formalin test with naloxone reversal. These results suggest that indigo has an anti-inflammatory action that may be involved with COX-2 and NF-κB, the reduction of these mediators contributed to the analgesic action in inflammatory pain and also to the reduction in peripheral pain.

1. Introdução

1.1. Processo Inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta do sistema imune a diferentes danos físicos, químicos, micro-organismos ou mesmo traumas cirúrgicos, no qual ocorre liberação de mediadores endógenos que iniciam os cinco sinais cardinais da inflamação como calor, rubor, tumor e dor, descritos por Celsus no século primeiro depois de Cristo (Serhan & Savil 2005). O "calor" representa aumento da temperatura no local, enquanto o "rubor" ocorre pela dilatação de pequenos vasos que aumenta a permeabilidade vascular. O terceiro sinal, "tumor", é o resultado do edema causado por extravasamento de plasma no local. Juntos, os três sinais exercem pressão sobre as terminações nervosas que junto mediadores pró-inflamatórios presentes na região edemaciada ativam nociceptores, gerando o quarto sinal, "dor". Em 1858, Rudolph Virchow descreveu o quinto sinal, que, acompanha todo o processo inflamatório e resulta na perda de função do órgão ou do tecido em que ocorre o processo inflamatório (Medzhitov, 2010 e Lawrence *et al*., 2002).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo visando restaurar a homeostasia com resolução ou finalização do processo; contudo, quando esta resposta não é adequadamente modulada, ocorre exacerbação da mesma, que pode tornar-se crônica e conduzir à perda de função temporária (Gilroy *et al*., 2004).

A resposta inflamatória crônica é, desde sempre, objeto de estudo já que contribuí para instalação de doenças como arteriosclerose, obesidade, câncer, doença pulmonar crônica obstrutiva e asma (Nathan & Ding, 2010). Outros exemplos como doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide, resultado de intensiva infiltração leucocitária

no fluido sinovial, essa última afeta 0,5 a 1% da população mundial (Silman & Pearson, 2002).

O processo inflamatório é multicelular e multimolecular cuja resposta ocorre em duas fases temporais distintas; a primeira aguda envolve vasodilatação seguida de aumento da permeabilidade capilar culminando com intensa infiltração leucocitária. A fase crônica e proliferativa com manutenção da migração celular e ocorrência de fibrose (Chopade & Mulla, 2010). Embora as fases sejam distintas, o processo envolve múltiplos elementos fisiologicamente interligados na cascata de inflamação, fazendo dele um evento bioquímico complexo.

O Fator Nuclear kappa B (NF-κB) merece destaque na cascata inflamatória já que regula e codifica genes pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e proteínas de fase aguda (Frode Saleh & Calixto, 2000). Em condições homeostáticas normais, o NF-κB encontra-se ligado ao Inibidor κB (IκB); após estímulo inflamatório (LPS, citocinas) ocorre fosforilação do IκB que uma vez fosforilado libera o NF-κB que se adere ao núcleo em uma região promotora, que codifica vários genes promovendo produção de diversos mediadores inflamatórios como citocinas (interleucina 1β –IL-1β e fator de necrose tumoral α- TNF-α), além de enzimas pró-inflamatórias como ciclo-oxigenase induzida (COX-2) e NO sintase (iNOS) (Niederberger & Geisslinger, 2008).

Dos mediadores inflamatórios regulados pelo NF-κB encontram-se as citocinas; a elas são atribuídas diversas funções fisiológicas como desenvolvimento do tecido linfoide e controle do processo de regeneração; entretanto, elas desempenham papel crucial no processo inflamatório, pois estimulam a produção de moléculas de adesão para infiltração celular, ativação de linfócitos e estímulo para a produção de outros mediadores inflamatórios (Bauer *et al*., 2012 e Bilate, 2007).

Dentre as citocinas destaca-se o fator de necrose tumoral α (TNF-α) descrito por Carswell *et al*., (1975) como uma endotoxina capaz de promover a necrose em tumores. Essa citocina desenvolve funções biológicas essenciais como proliferação, diferenciação e sobrevivência, além de amplo espectro de respostas para quadros de estresse e danos ao organismo (Mazzon *et al*., 2008). O TNF-α participa de respostas inflamatórias envolvendo a presença de bactérias Gram – negativas sendo, em alguns casos, um dos principais responsáveis por quadros de sepse (De Souza *et al*., 2005).

Outra citocina atuante no processo inflamatório é a IL-1β, presente em macrófagos, monócitos e células endoteliais, quando ativados durante uma infecção. A IL-1β, em baixas concentrações promove inflamação local por atuar em células endoteliais, aumentando as moléculas de adesão que ativam leucócitos recrutando-os ao sítio inflamatório. Já em altas concentrações, a IL-1β promove ativação do NF-κB e induz ao quadro de febre por promover aumento na síntese de COX-2, com consequente aumento dos níveis de PGE_2 no centro termorregulador do hipotálamo (Dinarello, 2005). Perifericamente, essa interleucina é responsável pelo aumento da produção de IL-6 que por sua vez, atua na medula óssea aumentando a mobilização e maturação de neutrófilos induzindo ao quadro de neutrofilia (Sadik *et al*, 2011).

Além da produção de citocinas, o NF-κB é responsável pela expressão de enzimas pró-inflamatória como ciclo- oxigenase induzida (COX-2) que normalmente tem sua expressão aumentada nos quadros inflamatórios. Há de se ressaltar que a COX apresenta dois subtipos, sendo a isoforma conhecida como COX-1 constitutiva; ligada a funções relacionadas a homeostasia, principalmente na gastroproteção onde a COX-1 promove a liberação de PGE_2 e PGI_2 gástricas que promovem no estomago aumento do fluxo

sanguíneo, estímulo à produção de muco e bicarbonato contribuindo para a manutenção do pH na superfície da mucosa estomacal (Rouzer & Marnett, 2009 e Wallace 2008).

No processo inflamatório, a via da PGE_2 é iniciada através da conversão de fosfolipídios da membrana plasmática em ácido araquidônico (AA) por ação enzima fosfolipase A_2 (citosólica). O AA é imediatamente metabolizado por ação da COX-2 em PGH_2 a qual é subsequente convertida em PGE_2 (um potente mensageiro lipídico da família dos eicosanoides; trata-se de um ácido carboxílico com esqueleto de 20 átomos de carbono contendo um anel de ciclopentano em sua estrutura) através da ação da PGE_2 sintase (Legler *et al*., 2010 e Medeiros *et al*., 2012). Esse processo bioquímico gera uma grande quantidade de PGE_2 que uma vez produzida e liberada das células estimula por ação autócrina e parácrina, a produção de mais prostanóides (Kummer & Coelho, 2002).

O papel pró-inflamatório da PGE_2 deve-se a sinais de transdução via receptores de prostanóides E (EP), membros da família de receptores com proteína G acoplada (Legler *et al*., 2010 e Medeiros *et al*., 2012). Quando o prostanóide se liga a esses receptores ele promove a produção e liberação de IL-8 uma interleucina com potente ação quimiotáxica, que estimula o influxo de neutrófilos, macrófagos e mastócitos; neste último, a PGE_2 promove degranulação e liberação do fator de crescimento endotelial, MCP-1 (proteína quimiotáxica de monócitos) presente em quadros de câncer (Kalinsk, 2012).

A infiltração de leucócitos é um dos mais importantes fatores da inflamação, pois produz liberação de óxido nítrico (NO) pela enzima oxido nítrico sintase do tipo induzida (iNOS). A iNOS, por sua vez, é ativada por vários estímulos imunológicos que levam à produção de grandes quantidades de NO, com atividade citotóxica, contribuindo para a indução da inflamação aguda e manutenção da inflamação crônica (Pokharel *et al*., 2006). Dentre os leucócitos que participam da infiltração celular destacam-se:

a) neutrófilos: São células polimorfonucleares, as primeiras a chegarem ao sítio da inflamação; medem de 12 a 15 µm, apresentam citoplasma acidófilo com grânulos finos, seu núcleo é dividido entre dois a cinco lóbulos (Sadik *et al*., 2011). Um importante marcador de neutrófilos é a enzima mieloperoxidase (MPO), que pertence à superfamília das peroxidases; neutrófilos, ainda na medula óssea, passam a produzi-la logo após sofrerem diferenciação em granulócitos (Malle *et al*., 2007).

b) Eosinófilos: Trata-se de outro leucócito polimorfonuclear; com diâmetro de 12 a 17 µm. Apresenta um núcleo em geral bi ou trilobulado, os grânulos são consideravelmente maiores se comparados aos neutrófilos. Tem capacidade de causar danos, disfunção e remodelação do tecido (Hogan *et al*., 2008), envolvidas na patogenia de fase tardia da asma, provocando lesões no epitélio alveolar (Bezerra- Santos *et al*., 2006).

c) Monócitos são células mononucleares presentes no sangue circulante (em torno de 10 a 15 %), ao receber um estímulo inflamatório em um tecido esse tipo celular aumenta sua migração para o sítio inflamatório onde ocorre a sua diferenciação em macrófago (Peakman & Vergani 2011).

d) Macrófagos: os macrófagos são células mononucleares que apresentam diversas habilidades na imunidade inata como a liberação de IL-12 e TNF – α e aumento na expressão da iNOS e COX-2 (Stout *et al.,*2005).

e) Linfócitos T: são células monucleares que desempenham importante papel na resposta imune adaptativa, como apresentação de antígeno e consequente ativação de células dendríticas, maturação de linfócitos B, recrutamento de linfócitos T CD8 citotóxicas, especializada em respostas antivirais e secreção de citocinas responsáveis pela diferenciação de diversos tipos celulares (eosinófilos e macrófagos) (Abbas, 2012).

f) Mastócitos: são células que apresentam receptores específicos para IgE na membrana, estão envolvidos diretamente com respostas alérgicas, quando os ligantes ativam os receptores os mastócitos liberam diferentes mediadores como exemplo histamina, além de heparina e LT. (Abraham & John, 2010).

Tem sido demonstrado que a migração de leucócitos apresenta papel essencial na permeabilidade capilar e formação de edema, além de estímulos inflamatórios e dolorosos (Cunha *et al*., 2008).

1.2. Dor

A dor é definida como sensação complexa e desagradável envolvendo múltiplos fatores como estilo de vida e ambiente (Teixeira & Figueiró 2001); pode ser de 2 tipos, aguda e crônica. O primeiro tipo está vinculado lesões e a traumas pós-operatórios e a sua persistência pode afetar a homeostasia gerando aumento de disfunções orgânicas que são prejudiciais ao paciente como hipoventilação, aumento do trabalho cardíaco e contração muscular reflexa (Calill & Pimenta, 2005)

Já a dor crônica é um problema de saúde pública e atinge em torno de 2 a 40 % da população sendo a prevalência em mulheres que apresentam patologias músculo esquelética promovendo alto custo para os sistemas de saúde (Olesen *et al*., 2012). Em países desenvolvidos há um gasto anual de US$ 1 trilhão por ano; nesses países há uma prevalência em torno de 30 % de pacientes que relatam a presença de dor crônica (Cipriano *et al*., 2011).

Do ponto de vista fisiológico, diferentes neurotransmissores (como exemplo mediadores inflamatórios) e receptores estão envolvidos na dor, o que torna a inflamação e

a dor intimamente ligadas, uma vez que a segunda é também um sinal característico da primeira. No entanto, qualquer discussão sobre dor propõe algumas distinções. A dor sem sensações psicossomáticas oriundas do meio externo é classificada como nocicepção definida como sinais eferentes das informações que acercam o tecido lesado (Jessel & Kelly, 1991), sendo um processo fisiológico iniciado pela ativação do limiar específico dos receptores de dor, a detecção de um estímulo nociceptivo está envolvida também com reflexos protetores essenciais para a sobrevivência do indivíduo (Lee and Tracey, 2013)

A propagação da dor é iniciada com ativação de receptores fisiológicos denominados nociceptores, que se encontram na parte mais distal das fibras nervosas, amplamente encontrados na pele, mucosas, membranas, fáscia, órgãos, vísceras, músculos, tendões e vasos sanguíneos (Almeida *et al*., 2004). Estes, geralmente são estimulados por substâncias algiogênicas como substancia P, bradicinina, ATP ou mediadores inflamatórios como a PGE_2 que atuam de maneira indireta na dor neurogênica (Basbaum *et al.*, 2009).

A transmissão do impulso nociceptivo se dá através de diferentes classes de fibras nervosas aferentes. Por exemplo, nociceptores térmicos e mecânicos têm um diâmetro pequeno e são constituídos por fibras A-δ mielinizadas, cuja condutância é de 5 a 30 m/seg e são responsáveis por sensação de dor aguda e bem localizada. Já as fibras nervosas do tipo C são amielinizadas e transportam os estímulos de maneira mais lenta, sendo responsáveis pela sensação dolorosa difusa (Pleuvry & Lauretti, 1996 e Almeida *et al*., 2004).

Dentre os receptores específicos encontram-se os opioides (μ e δ) que desempenham diversas funções, destacando-se modulação da dor e controle emocional (Kieffer & Gaveriaux- Ruff, 2002). Os receptores do tipo δ estão envolvidos com dor originada por

estímulo mecânico enquanto receptores do tipo μ transmitem impulsos nocivos mediados por calor (Scherrer *et al*., 2009). Outra classe de receptores envolvidos na da dor, os chamados receptores de potencial transitório (TRPs), trata-se de uma classe de receptores polimodais que respondem a estímulos químicos, físicos e térmicos com um total de seis membros TRPV1, 2, 3 e 4; TRPM8 e o TRPA1 (Dhaka *et al.,* 2006). Nessa classe de receptores destaca-se o TRPV1, que responde a estímulos térmicos e químicos e está amplamente distribuído na pele, trato gastrintestinal e bexiga urinária. O TRPV1 possui importante papel na modulação de diferentes tipos de dor como aquelas oriundas de inflamações neurogênicas e não neurogênicas, como câncer, colite ulcerativa e isquemia cardíaca. Essas características fazem do TRPV1 um alvo de interesse na terapêutica da dor (Mandadi & Roufogalis, 2008).

1.3. Terapia da Inflamação e da Dor

Em vista dos problemas de saúde causados pela inflamação e doenças de origem inflamatória a busca por fármacos e tratamentos eficazes para conter tais patologias são importante objeto de estudo. A busca por potentes analgésicos data do século XIX, quando Johann Andreas Buchner (1828) isolou a salacina da casca da *Salix alba*; passada uma década Raffaelle Piria denominou a salicina como ácido salicílico, que é encontrado naturalmente em algumas espécies de *Spirea*, logo o ácido salicílico apresentou diversas propriedade terapêuticas sendo tratado como uma panaceia, entretanto produzia irritações gástricas severas (Vonkerman & Van de Laar, 2010). Felix Hoffmann, em 1899, ao conseguir acetilar a molécula do ácido salicílico, acrescentou à analgesia as propriedades da droga, ácido acetil salicílico (AAS).

Para o tratamento das inflamações e dor, Drogas Anti-inflamatórias Não Esteroidais (DAINES) são indicadas como fármacos de primeira escolha no tratamento de doenças como artrite reumatoide, osteoartrite, além de cólicas renais (Vonkermann & Van de Laar, 2006). As DAINES constituem-se num grupo de fármacos de estrutura química variada com atividades analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Flower, 2003); todas as atividades são decorrentes da inibição da síntese de PGE_2 através da acetilação da COX-1 e 2, o que impede a conversão do AA em PGE_2, e gera prostanóides inativos (Amann & Peskar, 2002).

O uso indiscriminado e contínuo de DAINES pode levar a efeitos colaterais sérios, como o surgimento de ulcerações gástricas, as quais ocorrem por inibição da síntese de COX-1 diretamente ligada aos mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica (Yuan *et al.,* 2006). Além dos problemas envolvendo o trato gastrintestinal o uso excessivo das DAINES pode provocar outros efeitos colaterais como hipertensão, além de problemas renais (Chou *et al*., 2006).

Outro tratamento indicado principalmente para inflamações crônicas são aqueles à base de drogas anti-inflamatórias esteroidais, os glicocorticídes (GC); dexametasona e predinisona são muito usados em doenças ortopédicas como tendinites, bursites e compressões nervosas (Gali *et al*., 2000). O mecanismo de ação dos GC é de amplo espectro; ao atuar os GC impedem o NF-κB de expressar citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias (Barnes, 2006). Ao entrar no organismo e atravessar rapidamente a membrana celular os GC ligam-se aos receptores de glicocorticóide (GRα e GRβ), que ligados às subunidades P65 e P60 do NF-κB impedem a sua ação e, consequentemente, a expressão de todos os mediadores inflamatórios a ele relacionados. As subunidades também se ligam e ativam os elementos de resposta dos glicocorticóides

(GRE) (Dostert, 2004) que promovem a ativação da síntese de mediadores anti-inflamatórios como a anexina, (previamente conhecida como lipocortina), inibindo a ação de fosfolipase A_2 (FOA_2) (Little *et al.,* 1999). Além da anexina, o GC estimula ainda a transcrição de outros mediadores anti-inflamatórios endógenos como a IL-10 e antagonistas de receptores de IL-1 (Cuzzocrea *et al.*, 2007).

Por atuar na via do NF-κB e também por reduzir a produção de leucócitos na medula, o uso crônico de GC leva à de imunodepressão deixando os pacientes suscetíveis a infecções; o uso crônico promove desequilíbrio hidroeletrolítico, gerando quadros de hipocalemia, edema e hipertensão, além de prejudicar a reabsorção de Ca^{++} (induzindo osteoporose); 30 a 50% de pacientes crônicos recebendo GC desenvolvem quadros de osteoporose, sendo vértebras e costelas os locais mais afetados (Adachi *et al*., 1993). Além desses efeitos, os GC sintéticos levam à insuficiência da adrenal; tratamentos prolongados com GC reduzem a secreção do ACTH, que como consequência, reduzem a produção de cortisol gerando um quadro de hipoplasia da adrenal (Polito *et al.*, 2006).

Outra classe de fármacos atuantes na dor são os analgésicos opioides. Essa classe é indicada no tratamento de dor severa aguda ou crônica. Historicamente, o opioide mais famoso é a morfina, um alcaloide derivado do ópio encontrado nos frutos da *Papaver somniferum*. O analgésico foi descoberto por Friedrich Sertürner no século XIX o qual descreveu os primeiros resultados químicos e farmacológicos em 1816 (Duarte, 2005).

De maneira geral, os fármacos opioides atuam como agonistas do receptores μ, κ, e δ acoplados a proteína G com uma porção N terminal extracelular, sete α- hélices transmembrana e uma porção C- terminal intracelular (Branford *et al.,* 2012). Quando o fármaco se liga aos receptores ocorre a redução da enzima adenil ciclase com consequente diminuição dos níveis de AMPc dentro da célula. O resultado final é a redução da

fosforilação de proteínas e consequente redução da função celular. Outra via envolvida na ação dos opioides está relacionada a canais iônicos que reduzem a excitabilidade neuronal; isso ocorre quando a proteína G acopla-se diretamente ao canal. Dessa forma, a morfina promove um acúmulo de potássio que causa hiperpolarização da membrana inibindo a entrada de cálcio e a liberação de neurotransmissores, reduzindo dessa forma a excitabilidade neural (Law *et al*., 2000). Contudo, o uso crônico de morfina e seus derivados podem trazer efeitos colaterais como dependência e tolerância, efeitos colaterais como hipnose, alucinação, vômito e constipação também são comuns, bem como liberação de histamina, hipotensão e depressão respiratória (Branford *et al.,* 2012).

Baseados nos efeitos colaterais das DAINES e dos GC, além da tolerância e dependência química causada pelos opioides, estudos recentes buscam novas alternativas para o tratamento da inflamação e da dor. Chopade & Mulla, (2010) indicaram novos alvos para o estudo do tratamento das enfermidades relacionadas; dentre eles destacam-se: a) antagonistas de receptores da PGE_2 (principalmente do receptor E_2 os quais mostraram- se promissores em reduzir a dor); entretanto, há uma preocupação com o mesmo efeito colateral provocado pelas DAINES em relação às úlceras pépticas; b) antagonistas para TNF-α, como o certolizumab e golilumab, utilizados no tratamento de doença de Crohn e artrite reumatoide; todavia estudos recentes revelaram que a ação desse fármaco pode estar envolvida na formação de tumores e leucemia (Asarch *et al*., 2009).

1.4. Atividade Terapêutica das Plantas

Devido aos efeitos colaterais provocados por DAINES, GC, analgésicos opioides e imunossupressores, a biodiversidade vegetal tem se mostrado promissora no desenvolvimento de terapias alternativas no tratamento da dor e da inflamação.

A utilização de plantas no tratamento de doenças é tão antiga quanto a humanidade; ao longo dos séculos, as civilizações fizeram uso de plantas para o tratamento de tosse, resfriados, infecções parasitárias e inflamações (Cragg & Newman, 2013). Tradicionalmente, o uso de material vegetal e a forma na qual é utilizada no tratamento de doenças são transferidos oralmente de geração a geração em uma comunidade. A biodiversidade vegetal é fonte de novas moléculas e muito da terapêutica moderna tem como base a ação específica de metabólitos secundários sobre receptores e enzimas; esse avanço não teria sido possível sem a contribuição de produtos naturais oriundos de plantas superiores, de toxinas produzidas por animais e por microorganismos (Calixto, 2003), Newman & Cragg (2007) investigaram o surgimento de novas drogas entre os anos de 1981 e 2006; dentre as 1010 drogas descobertas no período de 25 anos, 275 (cerca de 30%) eram derivadas de produtos naturais. Esses autores continuaram a pesquisa nos cinco anos seguintes e notaram um crescimento de 32% no total de moléculas obtidas a partir de produtos naturais, sendo 13 delas com atividade anti-inflamatória (Newman & Cragg, 2012). Uma explicação plausível seria a enorme biodiversidade vegetal e seu potencial de gerar fitoterápicos, fitofármacos e/ou protótipos de novas drogas com importância econômica (Calixto, 2000). No tratamento das inflamações, em geral, diversos produtos de origem vegetal apresentam potencial farmacológico, especialmente em quadros inflamatórios crônicos; Khanna *et al*. (2007) apresentaram diferentes metabólitos

secundários de origem vegetal com ação sobre diversos moduladores inflamatórios; dentre eles destacam-se flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas e alcaloides.

1.5. Alcaloides

A palavra alcaloide é originaria do árabe e significa "alquali", uma denominação simples, para a "soda" da qual foi obtida, são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos. Os alcaloides são compostos nitrogenados de impacto na medicina e nos relacionamentos sociais (Souza-Falcão *et al*., 2008). Os alcaloides apresentam grande diversidade farmacológica; ações anticolinérgica, antitumoral, diurética, antiviral, anti-hipertensiva, analgésica e anti-inflamatória já foram descritas (Henriques, 2004).

Desde a descoberta da morfina muitos alcaloides, com propriedades terapêuticas no tratamento da inflamação, têm sido estudados; dentre eles, merece destaque: a) **bukitingina**, alcaloide obtido da *Sapium baccatum* (Euphorbiaceae) que mostrou potencial antiedematogênico no edema de pata induzido por carragenina, além de diminuir os níveis de PGE_2 e de leucócitos infiltrados no modelo de pleurisia induzida por carragenina (Panthong *et al.,* 1998); b) **berberina**, alcaloide encontrado nas espécies pertencentes ao gênero *Berberies* (Berberidaceae); esse gênero de plantas é amplamente utilizado para o tratamento de reumatismo e febre. Estudos realizados com esse alcaloide em modelos de inflamação mostraram promissora atividade anti-inflamatória ao reduzirem tanto o edema de pata quanto a permeabilidade vascular (Küpeli *et al*., 2002); c) **theacrina**, alcaloide obtido a partir da *Camelia kucha*, uma planta endêmica da China; além de apresentar atividade farmacológica sobre o sistema nervoso como sedação e hipnose, também é um anti-inflamatório potencial (Wang *et al.,* 2010); d) **evodiamina**, um alcaloide presente no

fruto da *Evodia rutecarpa* (Rutaceae) apresentou um significativo potencial analgésico no modelo de contorções abdominais em camundongos (Kobayashi, 2003); e) **brucina e óxido-N-brucina**, dois alcaloides presentes na *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae), apresentaram efeito protetor na dor induzidos por estímulos térmicos e químicos, nos testes de placa quente e contorções abdominais, respectivamente (Yin *et al*., 2003); f) **spectalina**, um alcalóide piperínico derivado da *Cassia spectabilis* (Fabaceae) pertencente à flora nordestina, também apresentou propriedades antinociceptivas em modelos clássicos de dor (Viegas Jr. *et al.,*2008).

1.6. Gênero *Indigofera* e o Índigo

Dentre os muitos alcaloides estudados na busca de novos fármacos encontra-se o índigo, um alcaloide bis-indólico (ilustração 2). Essa substância é conhecida desde a antiguidade e é obtida a partir de espécies do gênero *Indigofera* (Fabaceae), plantas tropicais presentes na África, Ásia e América do Sul (Maugard *et al*.,2001).

O gênero foi descrito por Linnaeus (1753) e apresenta cerca de 700 espécies; no Brasil, duas espécies ganham destaque, *I. suffruticosa e I. truxilensis*. Estas plantas são arbustivas (2,5 m de altura) e ramificadas (Moreira & Tozzi, 1997); são caracterizadas por possuírem folhas com folíolos numerosos desde a base até a inflorescência (Bortoluzzi *et al*., 2003). São espécies popularmente conhecidas como “índigo” e “anileira” e no Brasil ocorrem principalmente em ambientes de cerrado (Cola, 2006). A etnofarmacologia realizada com comunidades indígenas da América Central mostrou que a "anileira" é útil no tratamento de úlceras, além de ter sido utilizada como anti-inflamatória e analgésica (Roig, 1988). Cola- Miranda *et al*., (2006) observaram que o extrato metanólico da planta

apresentou efeito gastroprotetor. Alguns anos depois, Luiz- Ferreira *et al.,* (2012) confirmaram que a fração acetato de etila (com 24 % de alcaloides) também apresentou efeito antioxidante e citoprotetor em diferentes modelos de úlcera péptica.

O alcaloide obtido das partes aéreas da planta *Indigofera truxilensis* Kunth mostrou um potencial antioxidante e antiulcerogênico importante (Farias-Silva *et al*.,2007). Em outro estudo foi observado que o índigo reduziu os níveis de moléculas de adesão celular (VCAM-1 e ICAM-1) indicando uma possível redução da infiltração de leucócitos (Chang *et al*., 2010); os resultados citados apontam para atividade anti-inflamatória e corroboram para aquilo que foi visto no conhecimento popular; entretanto, há pouco conhecimento em relação às atividades anti-inflamatória dessa substância, o que estimulou e justificou investigar as propriedades terapêuticas do índigo sobre inflamação, em suas fases aguda e crônica e sobre o estudo da dor.

Ilustração 1 *Indigofera truxilensis* (Kunth) (Maíra Cola, 2006).

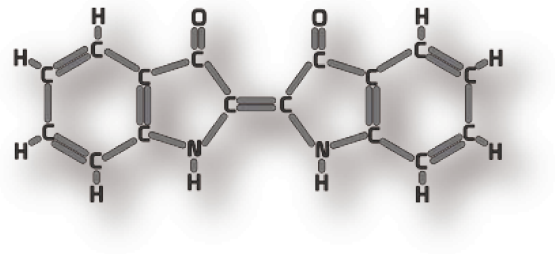


Ilustração 2 Molécula do alcaloide Bis-indolico índigo.

2. Justificativa

O conhecimento popular agregado aos dados científicos literários fornece uma grande quantidade de dados referentes à utilização de plantas medicinais para o tratamento da inflamação e dor, principalmente aquele do gênero *Indigofera*; estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Cola-Miranda *et al*., 2006; De Farias, *et al.,* 2007 e Luiz Ferreira *et al*., 2012) comprovaram a ação antiulcerogênica e antioxidante do índigo, justificando assim a aplicação do alcaloide índigo em estudos pré-clínicos de inflamação e dor.

2.1. Objetivos

Foram objetivos do presente trabalho:

- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória do alcaloide índigo em modelos clássicos de inflamação;
- ✓ Estudar o efeito do índigo na redução dos níveis de mediadores químicos, enzimas e fatores envolvidos na resposta inflamatória;
- ✓ Avaliar uma possível ação analgésica do índigo através de modelos de nocicepção que envolvam dor de origem neurogênica e dor de origem inflamatória.

3. Materiais e Métodos

3.1. Drogas Utilizadas

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: indometacina, ácido acético, cloridrato de morfina, ácido araquidônico, carragenina, formalina, capsaicina e Xilol (Sigma Chemical CO, U.S.A); Dexametasona (Laboratórios Ache). Cristal violeta (Merk CO, U.S.A). Cloridrato de Ketamina (Fort Dodge LTDA), Cloridrato de Xilasina (König Ltda. ARG) cloreto de sódio (CHEMCO, Campinas Brasil) e Hematoxilina- Eosina (Nuclear).

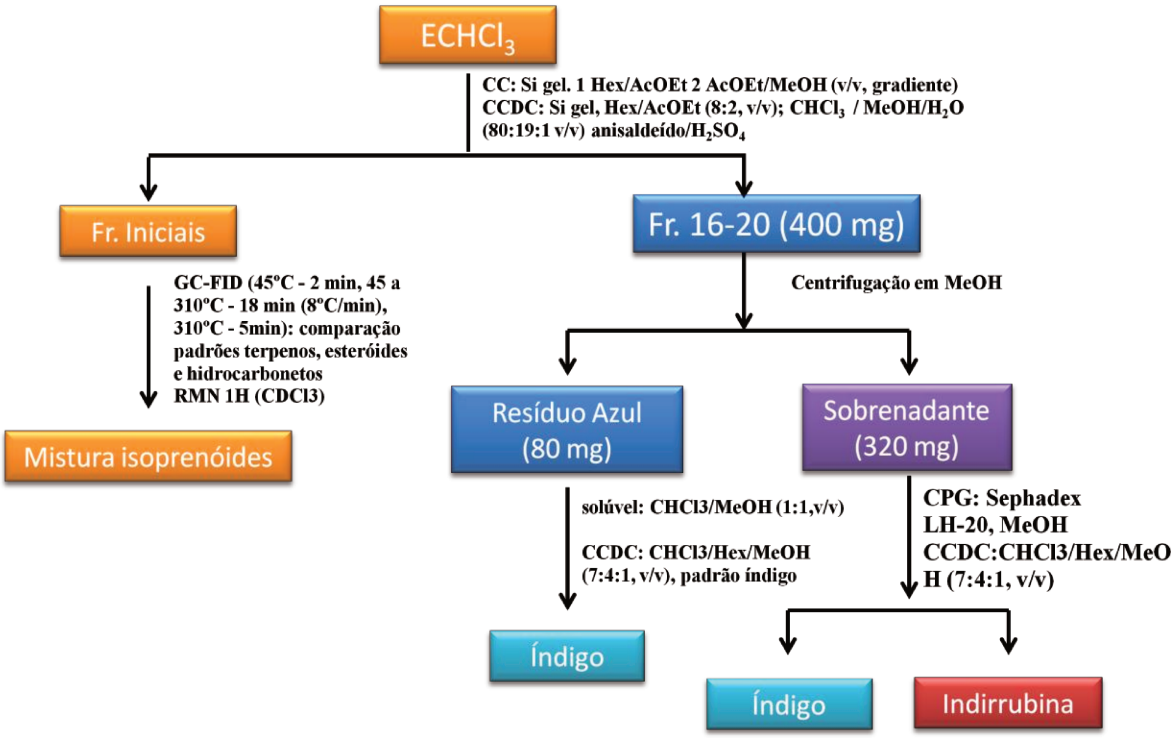
3.2. Coleta da Planta

Exemplares da *Indigofera truxillensis* foram coletados ao longo da estrada Domingos Sartori em Rubião Junior, município de Botucatu, estado de São Paulo. A identificação botânica foi realizada pelo professor Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia (IB); o espécime foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas, SP, Exicata n° 131.827.

3.3. Extração e Isolamento do Índigo

A obtenção do índigo foi realizada pela equipe do professor Wagner Villegas, através da tese de doutorado da aluna Tamara Regina Calvo (2007). Partes aéreas (galhos, folhas e frutos) da espécie de *I. truxilensis* foram secas 40° (em estufa) e moídas em moinho de facas; e em seguida, foi realizada a preparação dos extratos. A amostra seca (500 g) passou por um processo de maceração, em clorofórmio três vezes durante 48 horas. Deste modo foi obtido o extrato clorofórmico ($ECHCl_3$), com rendimento de 2,8% (14,3 g).

Após o processo de maceração e obtenção do extrato, o mesmo foi fracionado (3g) em cromatografia em coluna em sílica gel aonde houveram duas frações iniciais rica em isoprenóides e a fração (Fr.16-20); a partir dessa fração deu-se o isolamento e identificação dos alcaloides sendo o rendimento do índigo 80 mg (0,016 % baseado na quantidade de material vegetal inicial 500 g) de acordo com o fluxograma 1.



Fluxograma 1 Processo de obtenção do alcaloide índigo a partir das partes aéreas de *Indigofera truxilensis* (Kunth) CC (Cromatografia em coluna),CCDC (Cromatografia em camada delgada comparativa), CPG (Cromatografia de permeação em gel), GC-FID (Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama), RMN (Ressonância magnética nuclear).

3.4. Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada (20 ± 2º C), alternância de ciclos claro–escuro de 12 horas, além de água e ração *"ad libitum"*. Foram utilizados ratos UNIB:WH machos, com 8 semanas de idade e peso corporal entre 150 a 200 g e camundongos

UNIB:SW machos com 8 semanas de idade e peso entre 25 a 35 g. Os experimentos realizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA – IB - UNICAMP) protocolo nº1908-1, por estar de acordo com Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Nos experimentos onde foi realizada cirurgia, os animais foram anestesiados com Ketamina 0,5 ml/kg e Xilasina 0,1 ml/kg. Nos experimentos como edema de pata em que somente ocorreu a aplicação do agente indutor os animais foram anestesiados com halotano.

3.5. Grupos Experimentais

Os animais foram separados em grupos; o grupo tratado recebeu o índigo nas doses de 1.5; 3.0; 6.0 mg/kg via oral (v.o). O grupo Veículo foi tratado com Solução Salina Fisiológica 0,9% 10 ml/kg, v.o, os controles positivos são apresentados de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 1 Grupos tratados durante o trabalho.

Grupos Experimentais	Teste Anti-inflamatório	Teste Analgésico	Mecanismos
Veículo	✓	✓	✓
Índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/ kg)	✓	✓	✓
Indometacina v.o (5.0 mg/kg)	✓	✓	✓
Dexametasona v.o. (2.0 e 0.5 mg/kg)	✓		
Morfina s.c. (5.0 mg/kg)		✓	✓

3.6. Testes Farmacológicos – Modelos de Inflamação

3.6.1. Modelo de Edema de Orelha Induzido por Xilol

O experimento foi realizado de acordo com o modelo descrito por Young e De Young (1989), trata-se de um modelo que provoca vasodilatação seguida de permeabilidade vascular. Para este experimento foram utilizados camundongos UNIB:SW machos, separados em grupos de 8 animais/cada. Três grupos de animais receberam o índigo, enquanto os controles receberam INDO (controle positivo) e Veículo (controle negativo). Uma hora após o tratamento os animais tiveram a superfície interna e externa das orelhas limpas com etanol. Em seguida foram aplicados 20 µl de Xilol (PA) na superfície interna e externa da orelha esquerda; na orelha direita foi aplicado volume equivalente de Veículo. Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos padronizados das orelhas (8 mm) foram retirados com auxílio de um "punch". Cada disco foi pesado separadamente e a diferença do peso foi considerada como edema produzido pelo xilol.

3.6.2. Modelo de Edema de Orelha Induzido por Ácido Araquidônico

O experimento foi realizado de acordo com o modelo descrito por Schiantarelli (1982), com algumas alterações, este modelo o ácido araquidônico atua como substrato para ação da COX-2 e produção de prostanóides com consequente formação de edema. Para este experimento foram utilizados camundongos UNIB: SW pesando entre (25 e 35 g) separados em grupos de 8 animais cada e tratados previamente com o índigo e com os respectivos controles (Veículo e INDO). Uma hora após o tratamento os animais tiveram a superfície interna e externa das orelhas limpas com etanol. Em seguida foram aplicados 20

µl (100 µg/ µl) de ácido araquidônico na superfície interna e externa da orelha direita, na orelha esquerda foi aplicado o volume equivalente de solução salina fisiológica.

Após 1 hora os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as porções padronizadas da orelha foram retiradas com o auxílio de um "punch" (8 mm). Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença do peso foi considerada como o edema produzido pelo ácido araquidônico.

3.6.3. Edema de Pata Induzido por Carragenina

A aplicação subcutânea de Carragenina na pata dos ratos provoca aumento agudo progressivo do volume da pata injetada; este é um parâmetro útil na avaliação anti-inflamatória de novos compostos. Trata-se de um edema com ação seqüencial de diversos mediadores inflamatórios na primeira hora (histamina, serotonina, bradicinina, PAF e PGE_2) e tem seu pico edematogênico atingido por volta de 2 horas.

Nesse modelo de inflamação foram utilizados ratos UNIB: WH (n=5), que tiveram medidos, previamente, os volumes basais de ambas as patas traseiras através do equipamento Pletismômetro (UGO, Basile, modelo 7140) que determina deslocamento de líquido (ml) ocorrido durante inserção da pata no interior do recipiente e traduz o dado num valor digital. Os tratamentos dos animais foram feitos, por gavage, de acordo com os grupos descritos previamente. Após uma hora os animais receberam injeções sub-plantares nas patas posteriores (PP) de 0,2 ml de carragenina, a 500µg/ml na (PPD) e a de 0,2 ml de SSF na esquerda (PPE). O volume da pata dos animais foi medido após ½, 1, 2, 3 e 4 horas. O cálculo do edema é feito subtraindo o valor de cada um dos tempos daquele valor basal (Winter, 1962).

3.6.4. **Granuloma *Cotton Pellet***

Neste modelo há inserção de um *pellet*, que por se tratar de um corpo estranho ao organismo do animal, leva à infiltração de neutrófilos, seguida por fibroblastos que secretam colágeno para isolar o *pellet*. Ratos UNIB:WH machos foram separados em grupos de 7 animais cada. Os animais foram anestesiados e submetidos à inserção do pellet feito de fio dental (Johnson & Johnson) pesando 20 mg. O pellet foi retirado 7 dias após a implantação; no decorrer desse período, todos os animais dos grupos foram tratados diariamente com o índigo e os grupos controle receberam Veículo ou anti-inflamatório DEXA. No 8º dia os animais foram sacrificados, o pellet foi retirado e seco a 70º C por 18 horas. Após secagem o peso seco do mesmo foi determinado, subtraindo-se esse valor do peso inicial. O valor obtido foi considerado como relativo à fase proliferativa da resposta inflamatória. O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Swingle & Shideman com algumas modificações (1972).

3.6.5. **Modelo de Pleurisia Induzido por Carragenina**

A técnica foi descrita por Mikani e Miyasaka (1983). Foram utilizados ratos machos UNIB:WH (n=7) separados em grupos que foram tratados como descrito previamente, além de um grupo SHAM que recebeu apenas solução salina fisiológica na cavidade pleural. Após 1 hora da aplicação dos fármacos foram injetados 0,2 ml de carragenina 650 μg/ml em solução salina na cavidade pleural de cada animal.

Quatro horas após a carragenina os animais foram anestesiados e sacrificados por ensanguinação e tiveram a sua cavidade pleural aberta e lavada com 5 ml de tampão PBS heparinizado (5 μl/ml). O exudato resultante foi recolhido para a contagem total e

diferencial de (polimorfonucleares e mononucleares) em câmara de Neubauer. A contagem total foi feita a partir de 10µl do lavado e 190 µl de solução de Turk (solução mãe: 2 ml de ácido acético glacial, cristal violeta 1% em 1ml metanol e 97 ml de Água deionizada). Após contagem, valor obtido foi multiplicado por 50.000 para obter o valor total do infiltrado.

Já para a contagem diferencial lâminas foram preparadas com 200 µl de lavado que foram colocados em citocentrífuga durante 10 minutos a 430 G. Após esse tempo, as lâminas foram coradas com corante de Rosenfeld (129 ml de May grumald, 75 ml d Giemsa e 369ml de metanol) por 5 minutos. A contagem diferencial foi feita com a utilização de um contador digital de células (BENFER DO BRASIL MODELO CC 900) obtendo-se a porcentagem de polimorfonuclares e mononucleares infiltrados.

3.7. Estudo da Ação do Índigo nos Mediadores Inflamatórios

3.7.1. Dosagem de MPO no Lavado Pleural

Foi realizado o teste colorimétrico para medir a atividade da enzima MPO. Nesse experimento, o lavado pleural obtido como descrito antes foi centrifugado a 12.000 G a 4º C durante 15 minutos. Foram coletados 6,7 µl do sobrenadante os quais que foram misturados a 193,4 µl de um meio contendo 0,167 g/l de Dihidrocloreto de O- Dianisidina, 0,0005% H_2O_2 diluído em tampão fosfato 50 Mm, (ph 6,0). O sobrenadante (acrescido do meio) foi lido em placas de ELISA a 450 nm. Cujos valores de absorvância foram obtidos durante 10 minutos em intervalos de 1 minuto e comparados com a curva padrão (MPO de leucócitos humanos). Os valores da MPO foram expressos em µg/ ml de lavado (Frode Saleh, 2000).

3.7.2. Dosagem de Nitrito e Nitrato em Lavado Pleural

O teste foi realizado de acordo com as especificações do Kit colorimétrico obtido da Cayman Chemical Company ®– EUA (Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit – Item n° 780001) e a leitura do ensaio foi realizada em leitor de ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmBH & Co, Bad Wildbad, Germany), ajustado para 540 nm, para obtenção dos valores de absorbância como previamente descrito.

3.7.3. Dosagem de PGE2 em Lavado Pleural

Os níveis de PGE_2 foram determinados através de kit de ensaio imuno- enzimático (R&D systems® e BioEleven®). O princípio da técnica está baseado na reação antígeno-anticorpo. A curva padrão (2500 pg/ml – 39 pg/ml) foi primeiramente realizada e, após a pipetagem dos volumes da curva outros 150 µl das amostras foram adicionados aos poços restantes. Em seguida foram adicionados 50 µl de anticorpo primário; a placa foi incubada, à temperatura ambiente, por 1h em agitador de placas (500 rpm). Depois desse período, foram acrescidos aos poços 50 µl de PGE_2 conjugada; a placa foi novamente incubada por duas horas em agitador de placas. Terminado o tempo de incubação, a placa foi lavada em lavadora de placas, quatro vezes, com tampão de lavagem (wash buffer). Após lavagem foram acrescidos 200 µl de solução substrato em cada um dos poços e a placa foi incubada por período de 30 minutos protegida da luz. Decorrido o tempo de incubação foi adicionado a cada poço a mistura de soluções de substrato A e Substrato B e, em seguida, 100 µl de solução Stop (H_2SO_{4-} 2N). A densidade óptica foi determinada em até 30 minutos usando leitor de placas ELISA Apollo LB 912 (Berthold Technologies GmBH & Co, Bad Wildbad, Germany), ajustado para 450 nm com correção de onda em 540 nm.

3.7.4. Dosagem de TNF-α em Lavado Pleural

Os níveis de TNF-α foram determinadas através de kits de enzimo-imunoensaio (R&D systems® e BioEleven®). Inicialmente cada poço foi incubado com 100 µL de anticorpo de captura, em temperatura ambiente, overnight. Após esse período, foram pipetados 300 µL do diluente, um reagente composto de uma proteína básica com função preservativa da reação, por 1 hora. Foram adicionados 100 µL das amostras e da curva-padrão, ficando as mesmas incubadas por 2 horas. Todos os poços foram incubados então por 2 horas com o anticorpo de detecção para que a interleucina presente nas amostras pudesse se ligar ao anticorpo durante esse período. Após incubação de 2 horas, todos os poços foram lavados e aspirados 4 vezes, a fim de remover qualquer substância não ligada que pudesse interferir na reação, pipetando-se em cada um deles 100 µL de estreptavidina-HRP e deixando incubado por 20 minutos. O próximo passo consistiu na adição de 200 µL de uma solução substrato (obtida previamente através da mistura de dois reagentes), responsável pelo desenvolvimento da coloração da reação. Após 20 minutos de incubação, protegido da luz, cada um dos poços recebeu 50 µL da solução de parada (H_2SO_4 2 N). Durante esse período ocorreu desenvolvimento de uma coloração na mesma proporção e intensidade das concentrações de interleucinas que reagiram na fase inicial do processo bioquímico. O desenvolvimento da cor foi uniformemente interrompido pela solução stop. A leitura da absorbância foi realizada em ELISA a 450 nm com correção para 540 nm.

3.7.5. Preparo do Extrato Citosólico e Nuclear

Após os modelos de edema de orelha e pleurisia os tecidos obtidos dos diversos grupos e os lavados pleurais foram congelados em nitrogênio líquido; no caso do tecido da orelha, após congelamento, os mesmos foram macerados para melhor extração de proteínas.

Após maceração os tecidos foram armazenados em tubos plásticos. As amostras foram ressuspensas em 100 µl de tampão de lise gelado contendo 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl2, 10 mM kCl, 0.5 mM fenil- metil- sulfonil- fluoreto, 1.5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml leupeptina 0.1mM benzamidina, 0.5 mM Dl-Dithioterthol. As amostras assim obtidas foram centrifugadas a 800 G por 45 minutos e sobrenadante (extrato citosólico) foi recolhido. Após a obtenção do extrato citosólico, o pellet foi ressuspenso em 50 µl do novo tampão de lise gelado (20 mM HEPES ph 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM EDTA, 25% Glicerol v/v, 0.5 mM fenil- metil-sulfonil- fluoreto, 1.5 µg/ml de inibidor de tripsina, 7 µg/ml pepstatina, 5 µg/ml leupeptina 0.1mM benzamidina, 0.5 mM Dl- Dithioterthol) e centrifugado a 13.000 G por 45 minutos. Agora, o sobrenadante recolhido foi extrato nuclear.

3.7.6. Western Blotting (NF-κB, COX-1 e COX-2)

Após preparação dos extratos (citosólico e nuclear), a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Valores determinados de proteína (30 µg extrato citosólico e 20 µg para extrato nuclear) foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a 50 V até o final do gel de resolução "resolving" A seguir, as proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em equipamento de eletrotransferência (Transblot turbo – BIO RAD) com as membranas embebidas em solução tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), mantidas em amperagem constante de 1.0 A por 12 minutos. Após a transferência das proteínas, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau a 3% para verificar a eficiência da transferência. As

membranas de nitrocelulose, contendo as proteínas transferidas, foram incubadas em solução bloqueadora (PBS 0,05M pH 7,4, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5%) por uma hora, a fim de diminuir a ligação inespecífica de proteínas. Em seguida, as membranas foram submetidas a lavagens com tampão (PBS 0,05M pH 7,4 e Tween 20 0,05%), em intervalos de 10 minutos. A membrana foi incubada a 4□ C, durante a noite ("overnight"), usando anticorpo específico para P65 (subunidade NF-κB 1:1000), COX-1 (1:1000, código 160109) e COX-2 (1:500, código M160160) (Cayman, Chemical, USA). Na manhã seguinte (em torno de 12 horas após incubação), as membranas de nitrocelulose foram lavadas em tampão básico por 40 minutos e, em seguida, incubadas à temperatura ambiente, por 1h, com anticorpo secundário (código 61950, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA e código 2020, Santa Cruz). Para detectar as bandas imuno-reativas, os "blots" foram expostos à solução de quimioluminescência (ECL-plus-LumiGlo chemiluninescense substrate, Kirkegard and Perry Gaithersubrg, MD. USA) por 3 minutos, seguido de exposição em aparelho fotodocumentador para detecção de quimioluminescência. As densidades das bandas de cada amostra sobre as membranas foram capturadas para posterior quantificação da densitometria ótica, usando o Software Snap gene. Para confirmar a inserção das mesmas quantidade de proteína os valores foram corrigidos a partir da leitura das bandas referentes a β- actina (Sigma–Aldrich, MO, USA).

3.8. Modelos de Indução de Dor

3.8.1. Teste de Randall-Sellito

O modelo desenvolvido por Randall & Selitto (1957) avalia a redução do limiar de dor promovido por pressão junto a um processo inflamatório, e que analgésicos com ação no sistema nervoso central ou não podem modificar a esse limiar de dor. No experimento de Randall-Sellito foram utilizados ratos UNIB: WH. Divididos em grupos (n=7); os animais foram avaliados para se obter o limiar basal de dor por pressão (com limiar máximo de 350 g) no algesímetro (UGO, Basile, modelo 37215) e, logo em seguida, foram tratados com o índigo e os respectivos controles (Veículo e INDO). Uma hora após a administração das drogas os animais receberam 0,1 ml de carragenina a 500µg/ml na região intraplantar. Os animais foram submetidos novamente a avaçliação do limiar de dor em 1,2, 3 e 4 horas.

3.8.2. Análise Histológica da Pata de Ratos

Após o experimento de dor (teste de Randall e Selitto) e sacrifício dos animais as patas inflamadas foram retiradas para análise histológica. O objetivo da análise é fornecer imagem qualitativa da presença do edema, e formação do infiltrado leucocitário. Depois de serem retiradas, as patas foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado e depois colocadas em etanol 70 %. Em seguida, as amostras de tecido passaram por um processo de desidratação com etanol e xilol para então serem embebidas em parafina. Os blocos foram cortados em 5 µm, desparafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina.

3.8.3. Análise Imuno-histoquímica da Pata de Ratos

Para análise imuno-histoquímica as lâminas foram incubadas com tampão citrato de sódio (0,01 M) e submetidas a 3 ciclos de 1 minuto no microondas em gelo. Em seguida, as lâminas foram secas e a área dos cortes marcada com uma caneta *"pap-pen"* e lavada com tampão Tris-HCl, ph 7,8. Um bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio por 30 minutos foi realizado para em seguida proceder-se a incubação com anticorpo primário, a 4° C, overnight. Os cortes foram então lavados com tampão tris-HCl, incubados com anticorpo secundário acoplado com HRP durante duas horas, para depois serem reveladas com DAB e contra-corados com hematoxilina de Harris.

3.8.4. Modelo de Contorção Abdominal por Injeção de Ácido Acético

O modelo de contorções caracteriza-se por contração e rotação do abdômen sendo uma resposta motora ao estímulo aplicado via intraperitoneal. O ácido acético promove a liberação de vários mediadores e substancias algiogênicas que determinam a nocicepção. Neste experimento foram utilizados camundongos UNIB: SW machos separados em grupos de 8 animais. Os camundongos receberam o índigo e os controles Veículo e INDO por gavage. Uma hora depois receberam a administração de ácido acético a 0,6% via intraperitoneal. Após a administração do ácido os animais foram avaliados individualmente e o número de contorções verificado no período compreendido entre 6 a 21 minutos. A atividade antinociceptiva do índigo foi avaliada de acordo com o número de contorções abdominais (Koster *et al*. 1959).

3.8.5. Modelo de *Tail Flick*

O método descrito por Ness & Gebhart (1986) avalia a nocicepção induzida por estímulos térmico na cauda do animal através de uma lâmpada incandescente (50° C ± 3). Baseado na estimulação térmica de receptores de cauda do animal, o teste da retirada da caudaé sensível a drogas de ação central, obtendo sua resposta principalmente por reflexo espinhal. Foram utilizados camundongos UNIB:SW (n=8 em cada um dos grupos) com os tempos de latência basal previamente foram avaliados, selecionando- se apenas animais com tempo basal entre 2 a 4 s. Um dia após essa avaliação os animais receberam o índigo e os respectivos controles (Veículo e MORFINA). O período de latência foi avaliado durante 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após os tratamentos. O valor da atividade farmacológica foi calculado pelo Percentual de Efeito Máximo (PEM) através da seguinte fórmula.

PEM= (Latência teste-Linha Basal) / (*Cut-off*-Linha basal) x 100

O tempo de *cutt-off* foi dado aos 10 segundos para evitar qualquer dano a cauda do animal.

3.8.6. Modelo de Placa Quente

O modelo de placa quente visa avaliar a atividade analgésica, mediante estímulo nociceptivo térmico, indicado pelo tempo de latência em que o animal permanece na superfície aquecida da placa até exercer o comportamento de saltar ou levantar a pata. Diferente do modelo anterior (que mede reflexo de integração medular), o modelo de placa quente envolve uma resposta comportamental que é interpretada como uma resposta junto ao córtex cerebral. Grupos de 8 UNIB:SW, pesando entre 30 a 35 g, foram pré-tratados com as doses de índigo e os respectivos controles. Os animais foram selecionados 24 h antes, com base em sua reatividade para o teste e colocados em um cilindro de vidro de 24

cm de diâmetro sobre a placa quente mantida a 56º C (Eddie & Leinbarck, 1953). O tempo de latência é considerado como aquele entre o animal colocar a pata na superfície da placa e retirá-la; somente aqueles animais que demonstraram um tempo de reação na faixa de 3,9 – 6,9 foram selecionados. Após os tratamentos, todos os animais foram avaliados novamente nos tempos 0, 30, 60 e 90 min na placa quente e um período máximo de latência de 20 segundos, o qual foi estabelecido como completa analgesia.

3.8.7. Teste de Formalina

O modelo de injeção intraplantar de formalina que estimula nociceptores, é um experimento de dor bifásico, pois apresenta duas fases distintas; na primeira fase, com duração de cinco minutos após a injeção do agente flogístico, ocorre dor de origem neurogênica resultante da estimulação direta das terminações nervosas. Já na segunda fase, há estimulação dos nociceptores e também a liberação de substancias pró-inflamatórias no meio. Nesse experimento foram utilizados camundongos UNIB: SW (n=8) previamente tratados com índigo e com os controles (Veículo e MORFINA). Os animais receberam então a injeção intraplantar de 20 µl formalina (1%). Em seguida, à formalina, os animais foram colocados em caixas de observação e o tempo de lambida da pata foi registrado durante 5 minutos (fase neurogênica), os animais permaneceram na caixa, após 10 minutos (período de interfase) foram reavaliados durante 15 minutos onde foi registrado o tempo que o animal passou lambendo a pata; esse tempo corresponde à segunda fase do modelo, denominada fase inflamatória (Hunskaar & Hole, 1987).

3.8.8. Teste de Formalina com Reversão por Naloxona

Com o objetivo de avaliar se o índigo apresenta atividade analgésica por interação com receptores opioides. O teste de formalina foi novamente realizado, mas com pré tratamento com antagonista de receptor opioide, a naloxona.. Nesse modelo camundongos UNIB: SW (n=8) receberam 5,0 mg/kg de naloxona i.p. Após meia hora os animais foram tratados com o índigo e os respectivos controles (Veículo e Morfina 5.0 mg/kg). Depois de uma hora dos tratamentos os animais receberam a injeção intraplantar de 20 µl formalina a 1%. Os mesmos foram colocados então em caixas de observação, em que foi registrado o tempo de lambida da pata durante 5 minutos (fase neurogênica). Decorridos 10 minutos da primeira fase (interfase) os animais desenvolveram a resposta para a segunda (dor inflamatória) em que o tempo de lambida foi registrado durante 15 minutos (Tjølsen et al., 1992).

3.8.9. Teste de Capsaicina

O teste da capsaicina avalia o possível efeito analgésico de drogas na dor neurogênica via receptores TRPV1. Foram utilizados camundongos UNIB: SW machos. Os animais foram separados em grupos (n=8) que receberam por gavage o índigo, Veículo e MORFINA s.c. Uma hora após o tratamento foi feita 20 µl de capsaicina (2,0 µg/ml) injeção na região subplantar da PPD do animal. Durante o intervalo seguinte de 5 minutos o tempo que o animal lambe ou morde a pata foi usado como método de avaliação da dor (Sakurada *et al*., 1992).

3.9. Análise Estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com nível crítico igual ou menor a 0,05 para rejeição da hipótese de nulidade. Na presença de significância na ANOVA foi procedida a análise de contraste entre as médias aplicando-se os testes *a posteriori* de Tukey, com nível de significância igual ou menor a 0,05 dependendo do experimento. A análise foi feita através do software estatístico PRISMA.

4. Resultados

4.1. Ensaios com Atividade Anti-Inflamatória

4.1.1. Edema de Orelha Induzido por Xilol

Os dados obtidos nesse experimento estão apresentados na Figura 1 como diferença de peso das secções circulares das orelhas direita e esquerda. Nessa avaliação, realizada 1 hora após a aplicação do agente flogístico, as três doses do índigo apresentaram atividade antiedematogênica significativa ($p<0.001$); a dose de 1.5 mg /kg reduziu o edema em 42%, enquanto as doses de 3.0 e 6.0 mg/kg apresentaram redução 75% e 48%, respectivamente. O controle positivo INDO apresentou redução 71% em comparação ao controle negativo Veículo.

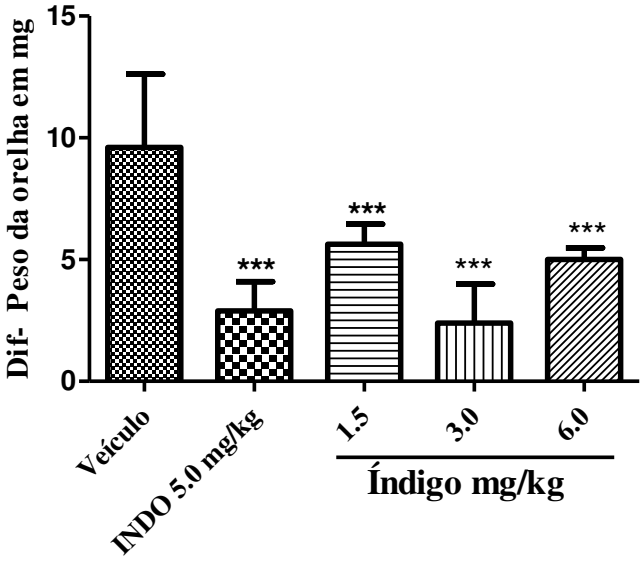


Figura 1 Avaliação antiedematogênica do alcaloide índigo (doses 1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) no edema de orelha induzido por xilol em camundongos (n=8). Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguido por teste de Tukey *** $p< 0.001$ em comparação ao grupo Veículo.

Observou-se, entretanto, que embora significativa inibição do índigo sobre o edema de orelha induzido por xilol não foi dose dependente.

4.1.2. Edema de Orelha com Ácido Araquidônico (AA)

Os resultados do tratamento com índigo, nas doses de 1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg sobre o edema de orelha induzido por AA estão apresentados na Figura 2. O alcaloide produziu uma redução do edema de 67%, 71% e 77%, respectivamente, enquanto o fármaco padrão indometacina (INDO 5.0 mg/kg), produziu inibição de 73 %.

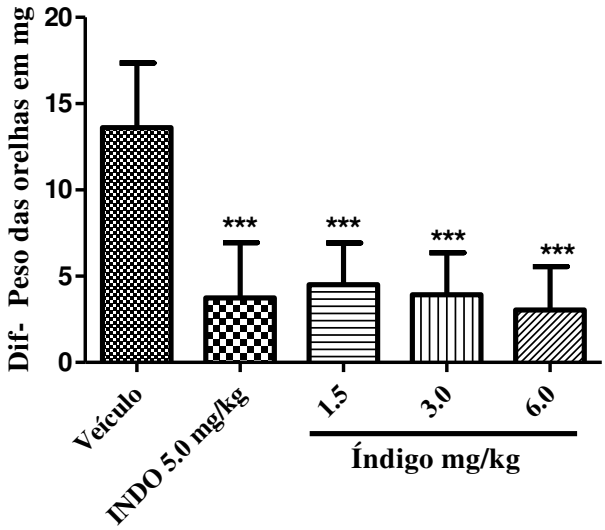


Figura 2 Efeito antiedematogênico do índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) e controle positivo indometacina (5.0 mg/kg) em modelo de edema de orelha por AA em camundongos (n= 8) . Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey, *** p< 0.001, em comparação a formação de edema do grupo controle negativo Veículo.

Embora a inibição de ambas, índigo e INDO, tenham sido significativas quando comparada ao grupo Veículo, não foram observadas diferenças entre as doses do índigo e o controle positivo INDO.

4.1.3. Edema de Pata Induzido por Carragenina

O modelo de edema de pata induzido por carragenina apresenta diferentes estágios de evolução da inflamação durante as quatro horas subsequentes ao agente flogístico. Os dados obtidos nesse experimento estão expressos na Figura 3.

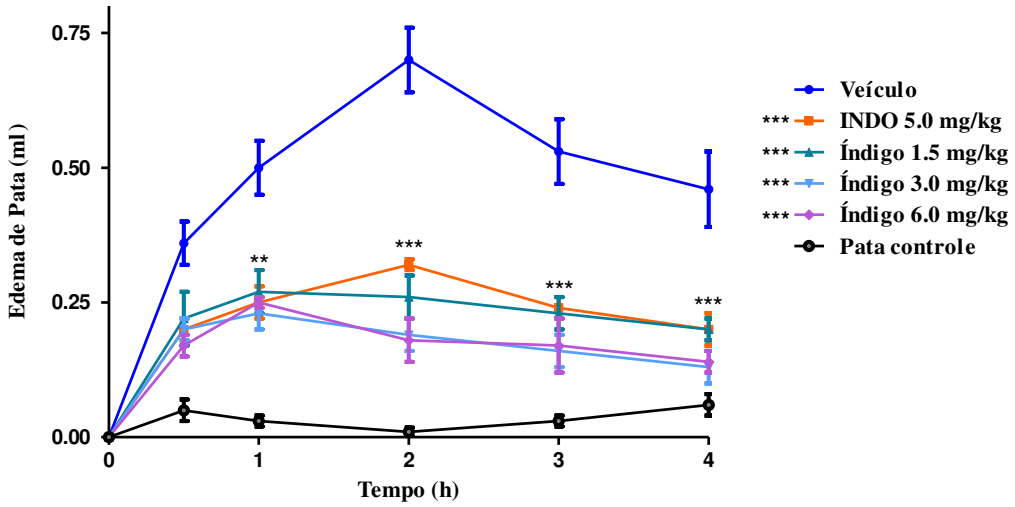


Figura 3 Efeito anti-inflamatório do alcaloide índigo em edema de pata de ratos (n= 5) induzido por carragenina, medições realizadas após ½ , 1, 2,3 e 4 h. Valores apresentados em média ± d.p do volume de água deslocado em ml. ANOVA seguido pelo teste de Tukey, **p<0.001 em comparação ao grupo Veículo.

No modelo executado as três doses do alcaloide Índigo apresentaram atividade anti-inflamatória significativa em comparação ao controle negativo Veículo. Na primeira meia hora as doses do alcaloide (1.5, 3.0 e 6.0) apresentaram 40, 44 e 52% de inibição, respectivamente enquanto, o controle positivo INDO apresentou 45% de inibição. Com uma hora de experimento as três doses do alcaloide Índigo apresentaram respectivamente 46, 50 e 53% de inibição; já o controle positivo apresentou 51% de inibição do edema. Na segunda hora, ocorre o pico do edema, o alcaloide apresentou, nas três doses testadas 63, 72 e 73,5 % de inibição respectivamente. O controle positivo INDO reduziu o edema em 54%.

Na terceira hora as três doses do alcaloide índigo apresentaram reduções de 57, 70 e 68% do edema respectivamente, enquanto o controle positivo INDO inibiu o edema em 55%. No último ponto, representado pela quarta hora, a substância em estudo apresentou reduções de edema 56, 71 e 69%, respectivamente, enquanto o fármaco padrão INDO apresentou 56% de atividade anti-edematogênica.

4.1.4. Análise de Western Blot para COX-2

A análise por western blot para COX-2 foi feita a partir do tecido obtido da orelha dos animais no edema de orelha induzido por ácido araquidônico. Os valores estão apresentados na figura 4, onde o índigo reduziu os níveis de COX-2 de modo estatisticamente significativo, em comparação àqueles do grupo Veículo.

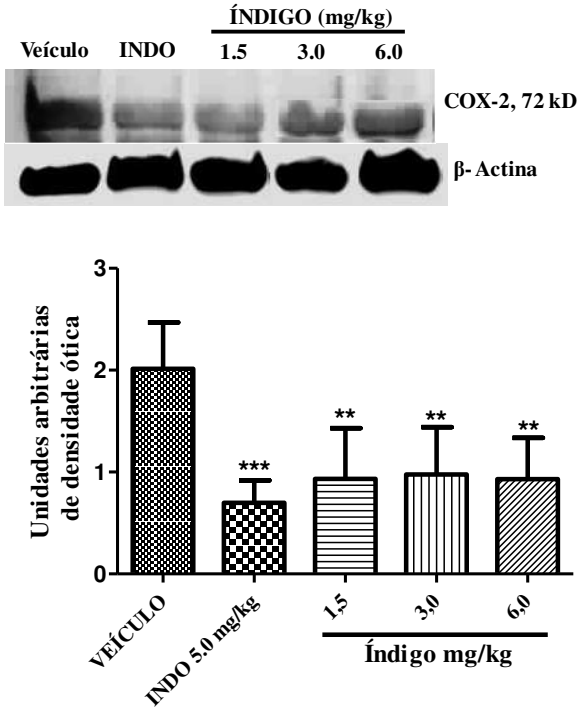


Figura 4 Efeito do índigo sobre a expressão da COX-2, através da orelha dos camundongos obtida pelo edema de orelha induzido por AA. Valores apresentados em Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey , ** $p<0.01$ *** $p< 0.001$, em comparação ao grupo Veículo.

As três doses do índigo empregadas (1.5, 3.0 e 6.0 mg/ Kg) apresentaram redução significativa de 53, 51 e 54 %, respectivamente. Enquanto a INDO reduziu o edema em 65 %, todos os dados comparados ao grupo Veículo. Novamente, não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes doses do índigo e nem entre o índigo e a INDO.

4.1.5. Análise de Western Blot para COX-1

Os resultados da Figura 5 mostram a análise de western blot referente aos efeitos dos tratamentos sobre a expressão de COX-1. Os resultados estão apresentados em unidades arbitrárias de absorbância.

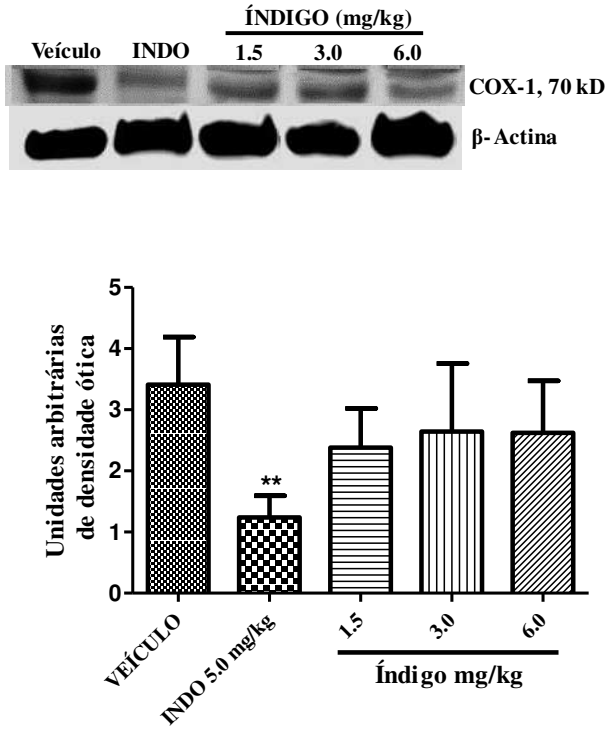


Figura 5 Efeito do índigo sobre a expressão de COX-1 através da técnica de western blot. Valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * *p< 0.01.

Apenas o controle positivo INDO reduziu em 64 % os níveis de COX-1, enquanto as diferentes doses de índigo não modificaram a expressão dessa enzima em relação ao grupo controle não tratado.

4.1.6. Análise de Western Blot para NF-κ B (p65)

Os resultados obtidos com o índigo, nas três doses estudadas, INDO e Veículo sobre a expressão da subunidade p65 do NF- κB estão demonstradas na Figura 6.

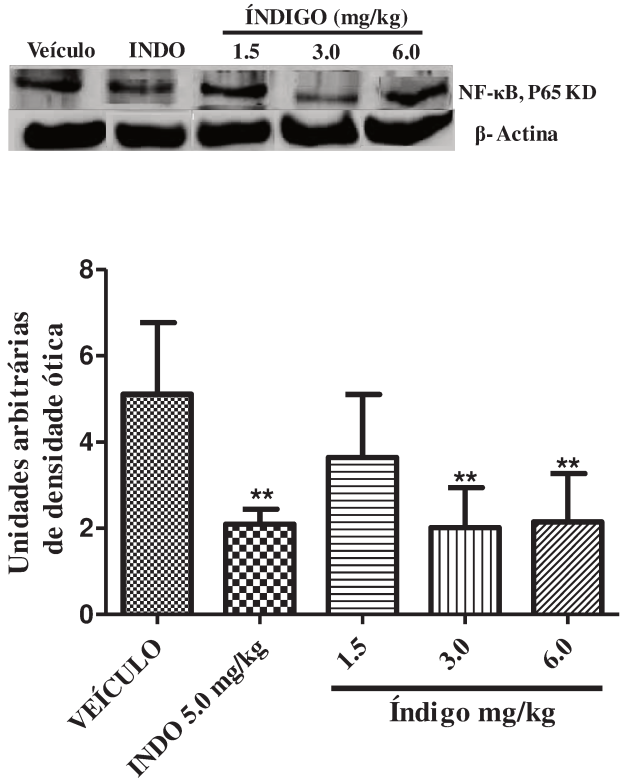


Figura 6 Efeito do índigo sobre a expressão da subunidade p65 do NF- κB através de western blot. Valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica e expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey , ** p<0.01.

O experimento por western blot realizado através do extrato nuclear para a unidade p65 do NF- κB revelou redução dos níveis da proteína em comparação ao grupo Veículo, de 59 e 57 % para as doses de 3.0 e 6.0 mg/kg, respectivamente. O controle positivo INDO

apresentou 61 % de redução na expressão da p65 em comparação ao grupo Veículo. A análise estatística revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 1.5 e 3.0 mg/kg de índigo e o controle positivo INDO.

4.1.7. Granuloma *Cotton Pellet*

O modelo inflamatório do granuloma *cotton pellet* avaliou as ações do índigo sobre o processo inflamatório mais cronicamente instalado (após sete dias), utilizando-se, como parâmetro de análise a redução ou não do infiltrado de neutrófilo em direção ao *pellet* implantado nos animais. Os dados obtidos nesse experimento são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 Avaliação da infiltração celular no modelo granuloma *cotton pellet*. Valores expressos em média ± d.p. ANOVA seguido pelo teste de Tukey *** p<0.001 em comparação ao grupo Veículo.

Grupos	*Pellet* Molhado		*Pellet* Seco	
	Peso (mg)	% de Inibição	Peso (mg)	% de Inibição
Veículo	400 ± 15	-	72 ± 7	-
DEXA	87, 7 ± 14,5***	78	18 ± 4 ***	73
Índigo 1.5	255 ± 33 ***	36	38 ± 6 ***	46
Índigo 3.0	183 ± 25 ***	54	30 ± 4***	58
Índigo 6.0	226 ± 29 ***	43	36 ± 3 ***	50

Na avaliação do *pellet* recém-retirado dos animais (*pellet* molhado), as três doses do alcaloide índigo (1.5; 3.0 e 6.0 mg/kg) reduziram em 36, 54 e 43% o infiltrado celular de modo estatisticamente significativo (p<0.001); o grupo controle DEXA apresentou redução de 78% (p<0.001) no infiltrado celular quando os dados foram comparados ao controle positivo Veículo.

Após 18 horas de secagem a 70°C os *pellets* foram novamente pesados e as três doses do alcaloide índigo se mostraram eficazes em reduzir o infiltrado celular em 46, 58 e 50 %, respectivamente. O grupo controle positivo DEXA apresentou redução de 73% no infiltrado quando comparado ao grupo controle negativo Veículo.

4.1.8. Pleurisia Induzida por Carragenina

O modelo de pleurisia utiliza-se da carragenina administrada na cavidade pleural do animal, o que induz uma inflamação com consequente infiltração de leucócitos. Neste modelo foram feitas contagens total e diferencial específica para células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), mononucleares e mastócitos encontrados no lavado pleural (após 4 horas da indução).

Na contagem total os valores são expressos como média ± d.p da estimativa celular na cavidade pleural. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 7.

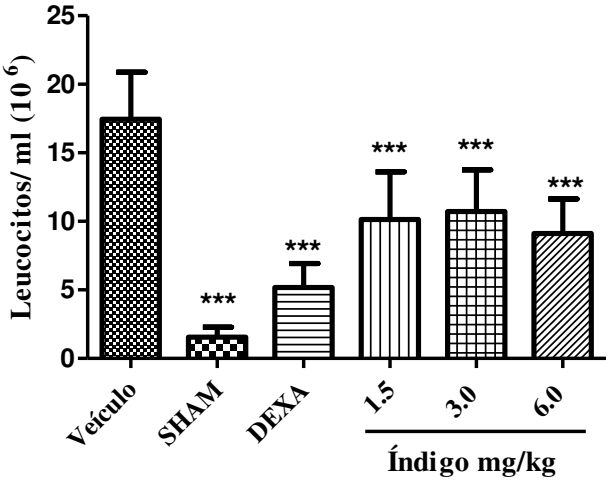


Figura 7 Inibição do infiltrado celular pelo índigo através do modelo de pleurisia induzido por carragenina. Valores apresentados em média ± d.p do total de células infiltradas na cavidade pleural em comparação ao grupo Veículo (exceto grupo Sham valores basais). ANOVA seguido de Tukey *** p< 0.001.

O alcaloide índigo inibiu, nas três doses, (1.5, 3.0 e 6.0 mg /kg), o total de leucócitos que migrou para a cavidade após a injeção de carragenina em 42, 42,5 e 48 %, respectivamente. Já o grupo controle positivo DEXA apresentou inibição de 70 %, enquanto aquela do grupo SHAM, que não recebeu agente flogístico, apresentou valores 90% menores que aquelas do controle negativo Veículo.

A Tabela 3 mostra que o tratamento dos animais, com índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg), produziu redução significativa na contagem de neutrófilos em 46, 50 e 58% respectivamente; enquanto o grupo controle positivo DEXA apresentou 78 % de redução. O grupo SHAM apresentou valores basais baixos de neutrófilos (0,3 ± 0,1 Neutrófilos/ ml $_X$ 10^6) em comparação ao Veículo (11,5 ± 2,5 Neutrófilos/ ml $_X$ 10^6).

Tabela 3 Contagem diferencial de leucócitos. Valores apresentados como média e d.p, comparados ao grupo Veículo. ANOVA Seguido de Tukey. ** p< 0.01 e *** p< 0.001.

Grupos	Neutr/ml (10^6)	% De Inibição	Mono/ml (10^6)	% De Inibição	Eosi/ml (10^6)	% De Inibição	Mast/ml (10^6)	% De Inibição
Veículo	11,5 ± 2,5	---	3,0 ± 0,7	---	1,3 ± 0,47	---	1,5 ± 0,5	---
SHAM	0,3 ± 0,1	---	0,7 ± 0,35	---	0,2 ± 0,2	---	0,4 ± 0,6	---
DEXA	2,5 ± 0,9	78***	1,0 ± 0,4	66***	0,4 ± 0,2	65***	1,1 ± 0,5	---
INDI. 1.5	6,1 ± 2,3	46***	2,1 ± 0,63	30	0,55± 0,1	57***	1,3 ± 0,6	---
INDI. 3.0	5,8 ± 2,8	50***	2,1 ± 0,8	30	0,52 ± 0,2	59***	1,2 ± 0,5	---
INDI 6.0	4,8± 1,6	58***	2,5 ± 0,5	17	0,47 ± 0,2	64***	1,2 ± 0,5	---

Com relação à infiltração de células mononucleares, apenas o grupo controle positivo DEXA apresentou 66% de redução na migração. Para essas células, os animais do grupo SHAM apresentaram valores basais 4 vezes menores que aqueles do grupo controle negativo Veículo.

O índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) também reduziu significativamente a infiltração de eosinófilos em 57, 59 e 64 %, respectivamente. Já os animais do grupo controle positivo

DEXA apresentaram redução de 65 % na infiltração desse polimorfonuclear. O grupo SHAM apresentou novamente valores basais bem mais baixos (cerca de 1/6) de eosinófilos no lavado pleural em comparação com o controle negativo Veículo.

Foram contados ainda no lavado pleural mastócitos; contudo, tanto o índigo, quanto a DEXA não apresentaram modificações significativas na migração desse tipo celular.

4.2. Estudo da Ação do Índigo nos Mediadores Inflamatórios

4.2.1. Dosagem de MPO Através de Ensaio Colorimétrico

A figura 8 apresenta os valores obtidos de MPO no lavado pleural de animais com pleurisia induzida por carragenina.

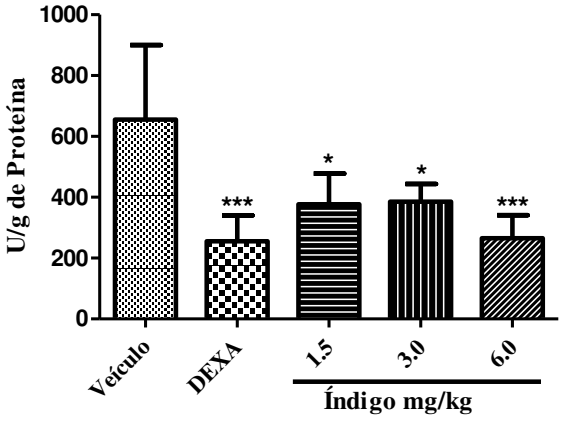


Figura 8 Avaliação dos níveis de MPO em lavado pleural (n=7) nos grupos tratados com Veículo, DEXA e índigo nas doses de 1.5; 3.0 e 6.0 mg/kg. * p< 0.05 e ***p< 0.001. Valores expressos em média ± d.p; Teste de ANOVA seguido por Tukey.

Nesse modelo experimental, as três doses do índigo apresentaram reduções significativas de 41, 40 e 58 % nos níveis de MPO nas doses de 1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg, respectivamente. O controle positivo DEXA (2,0 mg/kg) também reduziu em 60 % os níveis de MPO, em comparação à aqueles dos animais do grupo controle negativo Veículo.

4.2.2. Dosagem de Nitrito e Nitrato pelo Método de Griess

A figura 9 apresenta os valores obtidos de nitrato e nitrito através do teste colorimétrico de Griess realizados em lavado pleural de ratos submetidos a pleurisia por carragenina.

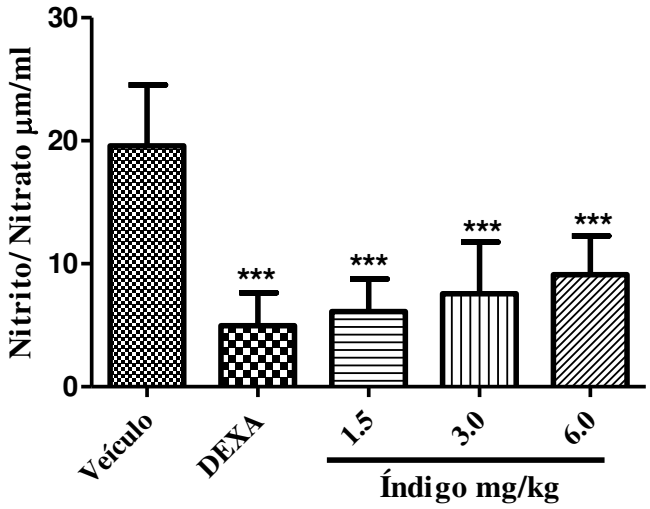


Figura 9 Estudo dos níveis de nitrato pelo método de Griess em lavado pleural coletado 4 horas após inflamação (n=7). Valores significativos ***p< 0.01 em comparação ao grupo Veículo, valores expressos em média ± d.p. Teste de ANOVA seguido por Tukey.

Nesse modelo, o índigo apresentou diminuições dos níveis de nitrito/nitrato para as três doses testadas de 69, 61 e 53 %, respectivamente. Do mesmo modo, os animais do grupo controle positivo DEXA apresentaram redução dos níveis de nitrato e nitrito de 75 % em comparação àqueles do grupo Veículo.

4.2.3. Dosagem de TNF- α Através de Teste de ELISA

A figura 10 apresenta dados relacionados aos níveis de TNF-α avaliados no lavado pleural de animais submetidos a pleurisia induzida por carragenina.

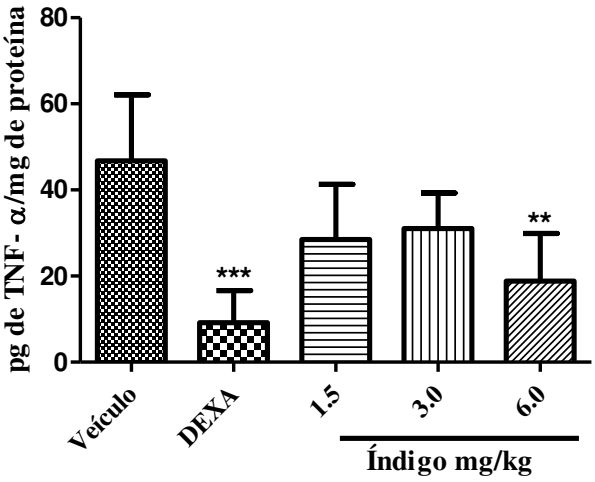


Figura 10 Efeito do índigo e controle positivo dexametasona sobre o TNF-α em lavado pleural (n=7), valores expressos em média ± d.p em comparação ao grupo Veículo. **p< 0.01 e *** p< 0.001, Teste de ANOVA seguido por Tukey.

Nesse experimento, apenas a dose de 6.0 mg/kg do índigo mostrou-se capaz de reduzir significantemente em 60 % os níveis de TNF-α em comparação àqueles do grupo controle negativo Veículo. Já os animais do grupo controle positivo DEXA apresentaram redução de 80 % (p< 0.001) nos níveis de TNF-α em comparação àqueles do grupo Veículo.

4.2.4. Dosagem de PGE2 Através de Teste de ELISA

Os níveis de PGE_2 no lavado pleural de animais que foram submetidos a pleurisia por carragenina estão resumidos na figura 11.

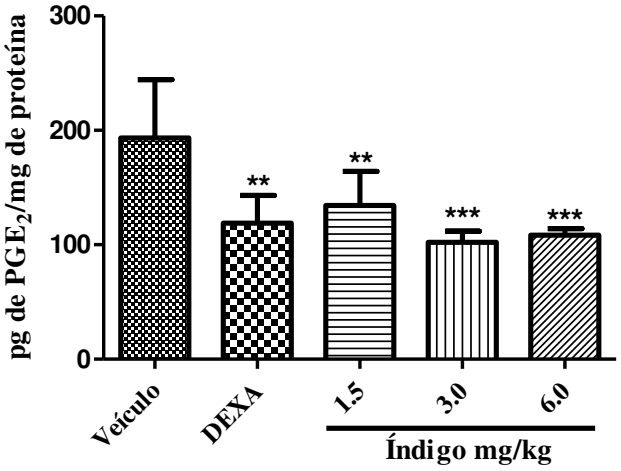


Figura 11 Efeito do índigo e controle positivo dexametasona sobre os níveis de PGE_2 em lavado pleural (n=7). Valores expressos em média ± d.p ** p< 0.01 e ***p< 0.001. Teste de ANOVA seguido por Tukey em comparação ao grupo Veículo.

As três doses do índigo reduziram de maneira significativa os níveis de PGE_2 em 33, 47 e 44 %, respectivamente. Os animais do grupo controle positivo DEXA sofreram redução de 40 % nos níveis de PGE_2 em comparação àqueles animais do grupo controle negativo Veículo.

4.2.5. Expressão da COX-2 por Análise por Western Blot

A análise por western blot para a expressão de COX-2 foi feita a partir das células obtidas do lavado pleural de animais submetidos ao modelo de pleurisia induzida por carragenina e os valores obtidos estão demonstrados na figura 12.

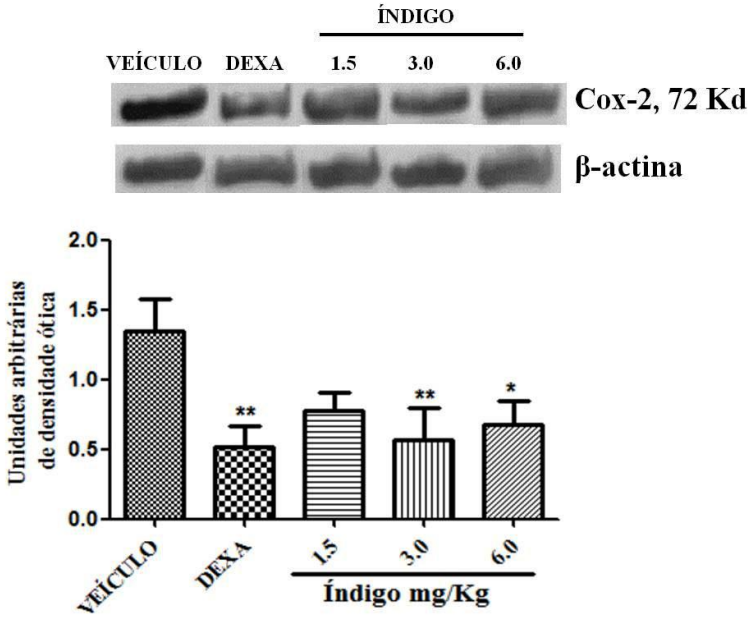


Figura 12 Avaliação da expressão de COX-2 por western blot em lavado pleural. valores apresentados sobre Unidades arbitrárias de densidade ótica. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey * p< 0,05 *** p< 0,001.

O índigo mostrou-se capaz de reduzir em 58 e 48 % os níveis de COX-2 em comparação àqueles dos animais do grupo Veículo, nas doses de 3.0 e 6.0 mg/kg , respectivamente. Já àqueles animais do grupo controle positivo DEXA apresentaram redução de 62 % nos níveis de COX-2 em relação àqueles dos animais pertencentes ao grupo controle Veículo.

4.3. Ensaios com Atividade Analgésica

4.3.1. Teste de Randall – Selitto

Os resultados apresentados na tabela 4 indicam a atividade anti-hipernociceptiva do índigo em modelo de dor induzida por pressão no teste de Randall & Selitto.

Tabela 4. Aumento do limiar de dor induzido pelo índigo e pelos controles positivos indometacina e morfina no modelo de Randall e Selitto. ANOVA seguido de Tukey, * $p<0.05$ e ** $p<0.001$ comparando os grupos tratados com o Veículo. # $p<0.01$ comparação dos grupos com o seu valor basal.

Grupos	Limiar de dor (g)				
	Basal	**1 hora**	**2 horas**	**3 horas**	**4 horas**
Veículo	208,6 ± 38	160 ± 11,5$^{\#}$	145 ± 16,4$^{\#}$	158,6 ± 17$^{\#}$	171,4 ± 22,6$^{\#}$
Indometacina	198,6 ± 29	250,0 ± 63*	231,7 ± 39*	230,0 ± 67,0	210,0 ± 59,1
Morfina	180,0 ± 10,9	288,3 ± 61$^{***\#}$	232 ± 67,6*	210,0 ± 53,6	195,0 ± 38,8
Índigo 1.5	198,3 ± 16	218,3 ± 68	253,3 ± 34**	216,7 ± 39,8	181,7 ± 35,4
Índigo 3.0	182,9 ± 9,5	218,6 ± 49	243,3 ± 62**	211,7 ± 44,0	197,1 ± 35,4
Índigo 6.0	225,7± 36	266,7 ± 29**	245,7 ± 33**	235 ± 62,2	218,6 ± 64,6

O índigo apresentou aumento da analgesia entre 1 e 2 horas após o estímulo por carragenina. Na primeira hora, apenas a dose de 6 mg/kg apresentou aumento significativo do limiar de dor (66%), comparado ao grupo Veículo, enquanto os controles positivos Indometacina e morfina apresentaram 56 e 80 %, respectivamente. Já na segunda hora, as três doses do índigo apresentaram aumentos estatisticamente significativos do limiar de dor (74, 68 e 69 %), respectivamente. Os controles positivos indometacina e morfina apresentaram um aumento de 60 %, sobre o parâmetro avaliado.

4.3.2. Histologia da Pata de Ratos

Através da análise qualitativa das lâminas obtidas a partir do tecido de patas inflamadas por carragenina (4 horas após experimento) o objetivo foi de avaliar dois parâmetros: formação de edema e infiltração leucocitária. Os resultados estão apresentados nas figuras 13 e 14 (marcadas de A-G).

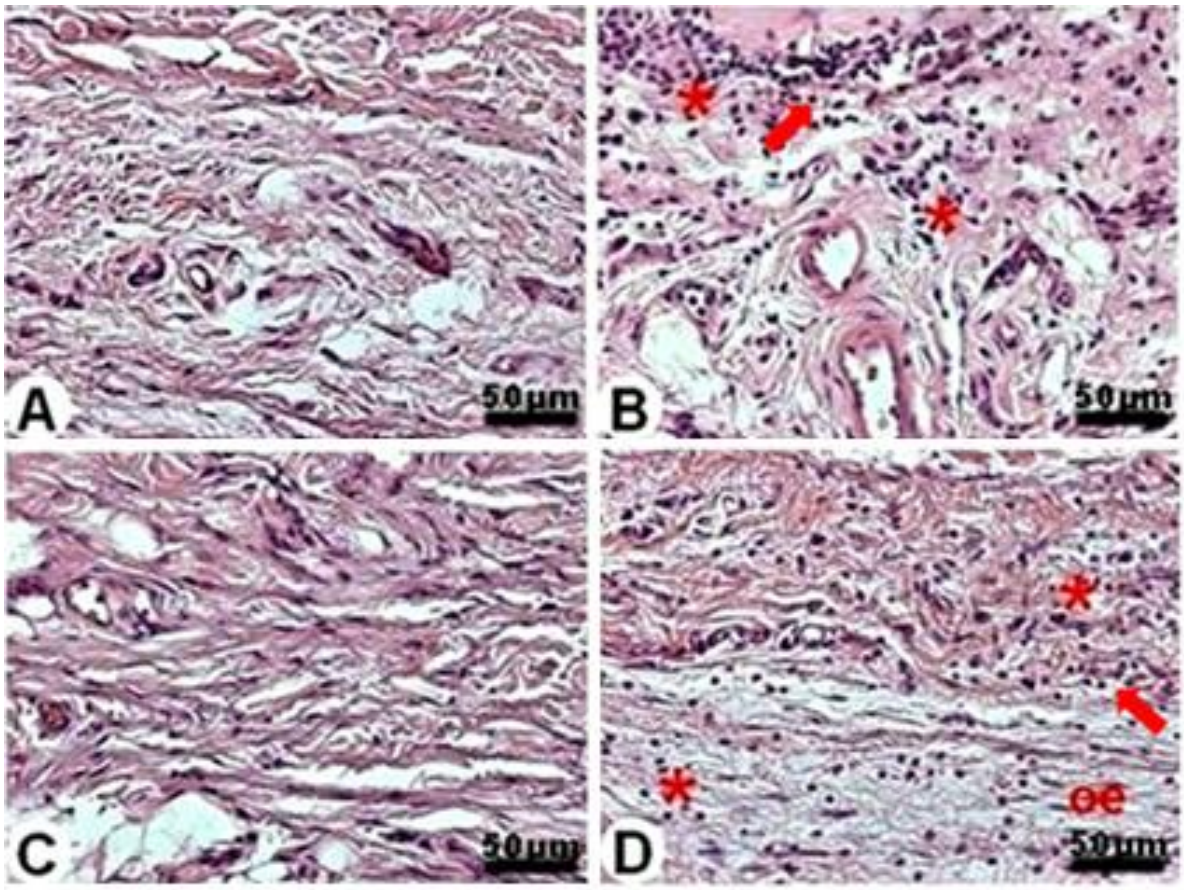


Figura 13 Fotomicrografias de cortes transversais de patas de rato tratados com veículo (A), veículo + carragenina (B), INDO (C), e morfina (D). Note em A a ausência de infiltrado de granulócitos e mononucleares na derme, enquanto em B observa-se presença de edema (asterisco) e infiltrado (seta) na derme. Em C não aparece infiltrado celular (granulócitos e mononucleares) e nem edema. No tratamento com morfina em D, note a presença de grande quantidade de infiltrado (seta) e edema (asterisco) na derme. Coloração H&E. Barras: = 200x.

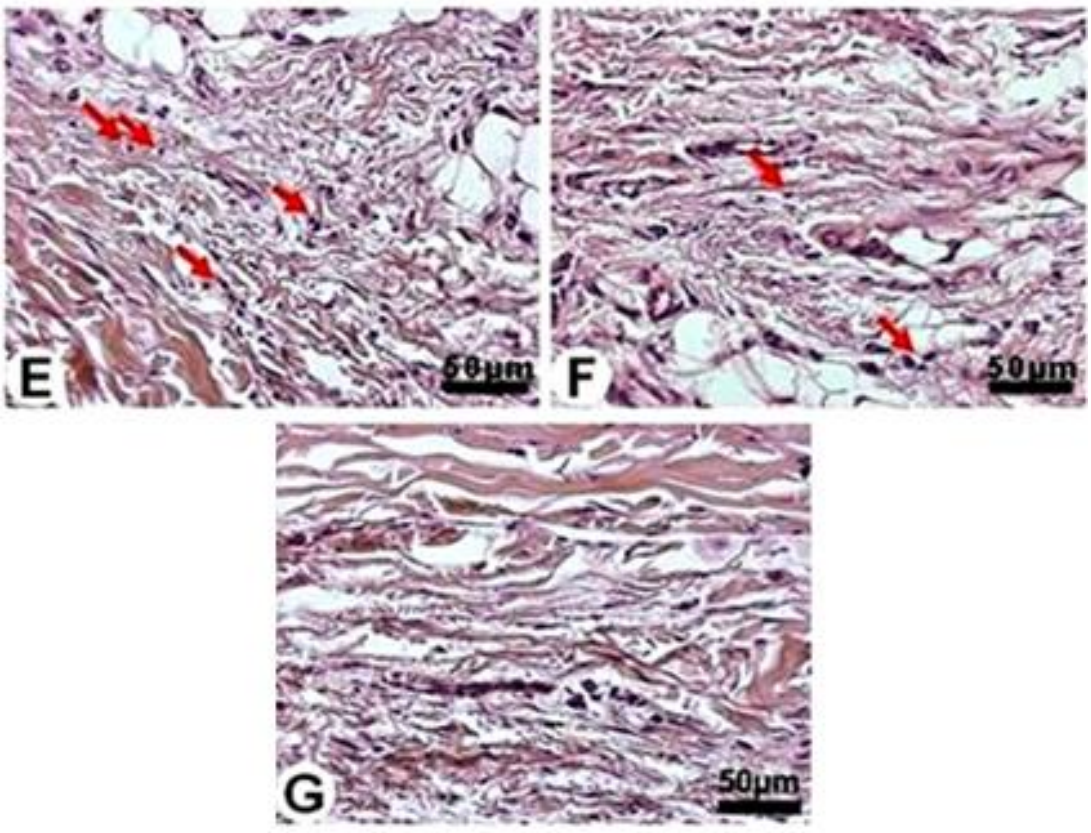


Figura 14 . E, F e G são fotomicrografias de cortes transversais de patas de rato tratados com 1.5 mg/kg (E), 3.0 mg/kg (F), 6.0 mg/kg indo (G) de índigo. Note em E a presença de infiltrado de granulócitos e mononucleares (seta) na derme. Já em F e G, observe a redu a redução do infiltrado celular e do edema na derme. Coloração H&E. Barras: = 200x.

Na figura 13A está apresentado o tecido obtido do grupo Veículo sem a aplicação de carragenina; notam-se tecidos epitelial e conjuntivo íntegros sem presença de edema e infiltração de leucócitos. Já na figura 13B, correspondente ao grupo Veículo + Carragenina, tanto edema quanto infiltrado celular estão presentes, indicando inflamação severa. No grupo INDO, correspondente a figura 13 C, observou-se redução do edema devido a ação da DAINE. Na figura 13D, que corresponde ao grupo MORFINA, foi observada extensa desorganização do tecido conjuntivo, presença de edema e aumento do infiltrado celular. Os grupos tratados com índigo correspondem as figuras 14 marcadas de E-G (doses de 1.5;

3.0 e 6.0 mg/kg), respectivamente e, assim como o controle positivo INDO, ocorreu atenuação do processo inflamatório com redução de ambos, edema e infiltrado celular.

4.3.3. Análise Imunohistoquímica da Pata de Ratos

As análises qualitativas apresentadas nas figuras 15 e 16 correspondem a imuno-histoquímica para a COX-2 nos grupos controle negativo e positivo e nos grupos de tratamento com o índigo, respectivamente.

As figuras 15 A e B correspondem ao grupo Veículo sem aplicação de carragenina; nota-se ausência de edema na região (A) e que apenas algumas células residentes do tecido conjuntivo, apresentam marcação pelo anticorpo COX-2 (B). Já nos em C e D são visíveis tanto presença de edema, quanto marcação do anticorpo para COX-2 em vasos sanguíneos (figura C); grande infiltração celular e reação positiva para COX-2 no componente extracelular estão demonstradas na figura D. Nas figuras E e F há redução de edema e da marcação positiva para COX-2 que está restrita apenas às células residentes do tecido conjuntivo, semelhante aos quadros A e B. Por fim, os quadros G e H representam o grupo MORFINA onde se nota formação de edema e presença maciça de infiltrado celular, além de marcação positiva para COX-2 nos vasos sanguíneos e no tecido conjuntivo.

A Figura 16 corresponde aos grupos tratados com índigo. As figuras A e B correspondem à dose de 1.5 mg/kg; em A ocorre presença de edema e marcação de COX-2 em vasos sanguíneos, enquanto no quadro B há presença de infiltrado celular e marcação de COX-2 na matriz extracelular. As figuras C e D correspondem à dose de 3.0 mg/kg do índigo; em C verifica-se redução de edema e marcação para COX-2 apenas em vasos sanguíneos, o que também está evidenciado em D, além da redução da infiltração celular em comparação ao grupo Veículo + Carragenina. As figuras E e F correspondem à dose de

6.0 mg/kg onde é observado redução do edema e da infiltração celular, e marcação de COX-2 apenas em vasos sanguíneos. Os quadro G e H correspondem a amostras que não receberam anticorpo primário e atuaram apenas como controle negativo para o andamento do experimento.

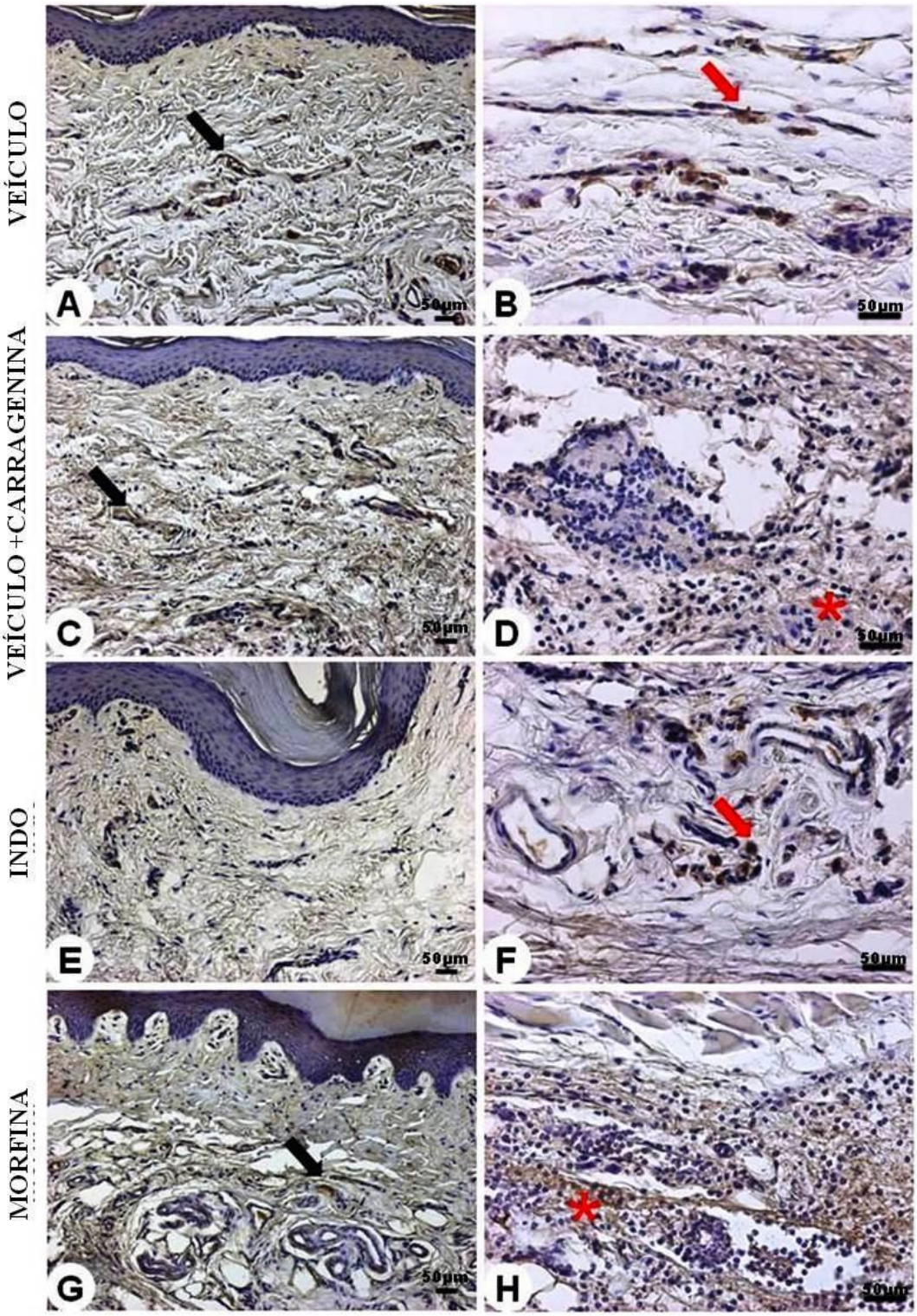


Figura 15 Fotomicrografias de imuno-histoquímica para COX-2 de cortes transversais de patas de rato tratados com veículo (A e B), veículo + carragenina (C e D), indo (E e F), e morfina (G e H). Identificações na figura: Seta preta indica reação positiva em vasos sanguíneos presentes na derme; seta vermelha indica reação positiva predominante no citoplasma de células residentes do tecido conjuntivo; asterisco vermelho indica reação positiva para COX-2. Imuno-histoquímica para COX-2 com contra-coloração de hematoxilina de Harris. Barras: A, C, E, G = 100x; B, D, F, H = 200x.

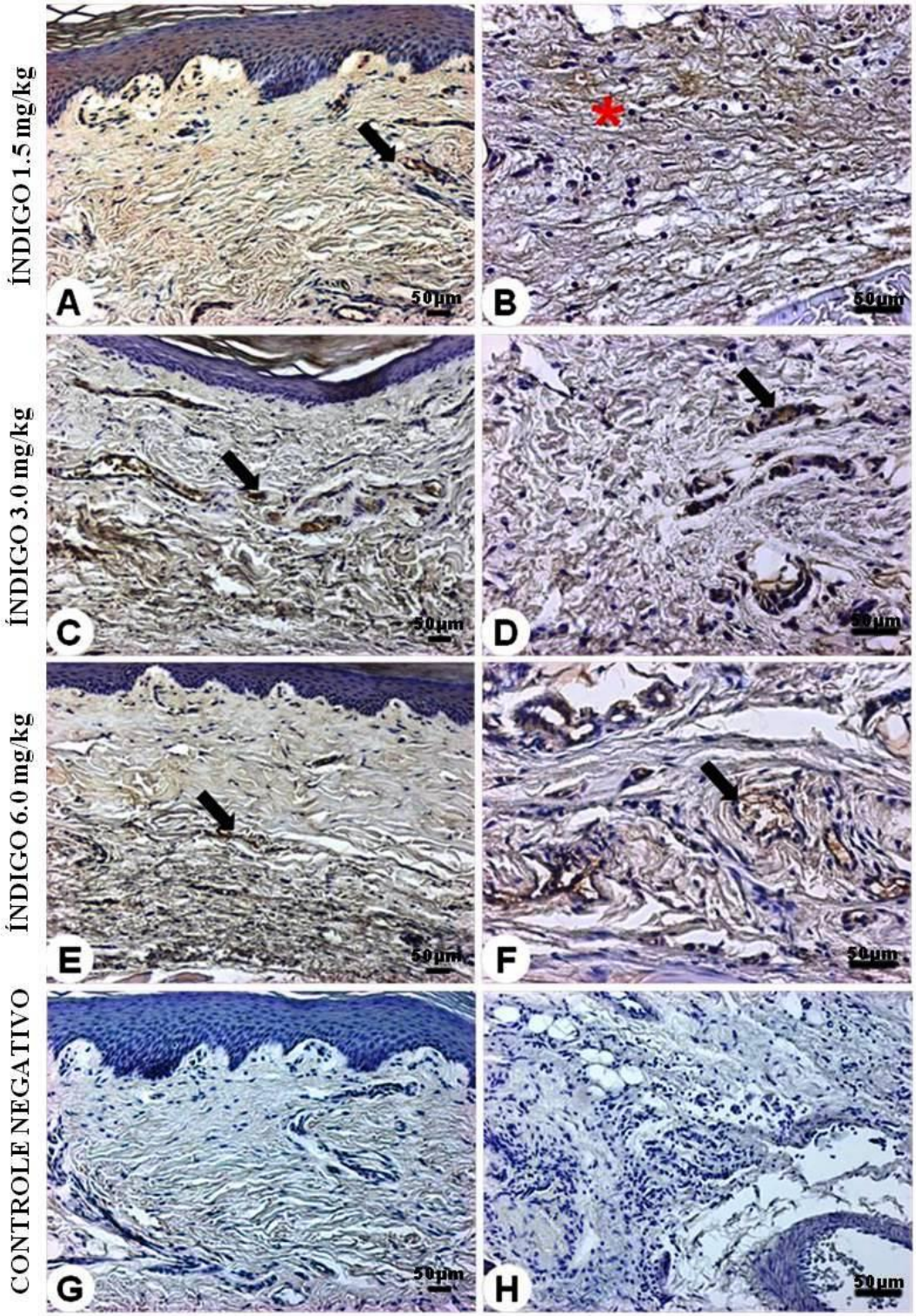


Figura 16 Fotomicrografias de imuno-histoquímica para COX-2 de cortes transversais de patas de rato tratados com 1.5 mg/kg (A e B), 3.0 mg/kg (C e D) e 6.0 mg/kg (E e F) de índigo. Note em A e B a reação positiva para COX-2, tanto em vasos sanguíneos (seta preta), quanto no compartimento extracelular (asterisco vermelho). Observe em C-F a marcação para COX-2 predominante em vasos sanguíneos (seta preta). Note ainda ausência de imuno-reação nos controles negativos, nos quais o anticorpo primário foi substituído por soro de mesma espécie que o anticorpo secundário. Imuno-histoquímica para COX-2 com contra-coloração de hematoxilina de Harris. Barras: A, C, E = 100x; B, D, F = 200x.

4.3.4. Contorções Abdominais

O tratamento oral com o índigo reduziu, de modo significativo, o número de contorções abdominais em 38, 40 e 38 %, respectivamente nas doses de 1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg em relação ao número de contorções apresentadas pelos animais do grupo tratado com Veículo. Da mesma maneira, a INDO reduziu em 64 % o número de contorções, quando comparadas àquelas dos animais do grupo Veículo. Esses resultados estão resumidos na Figura 17.

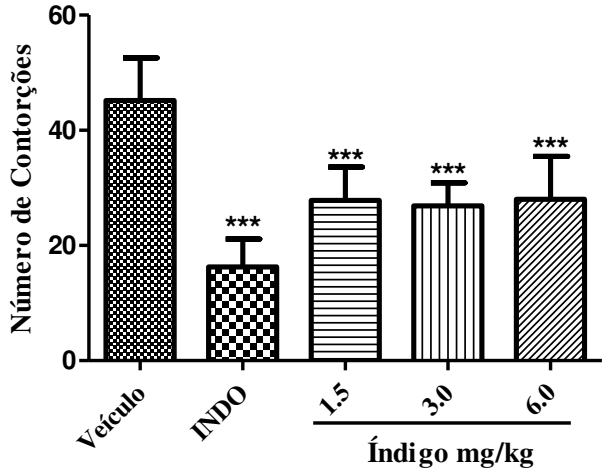


Figura 17 Efeito antinociceptivo do índigo e controle positivo indometacina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (n=8). Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguido por teste de Tukey *** p< 0.001 em comparação ao grupo Veículo.

4.3.5. Teste de Tail Flick

Nesse experimento, os animais tratados com índigo apresentaram um período de latência maior para retirada da cauda que aqueles pertencentes ao grupo controle Veículo. Os resultados são expressos em tempo da latência (Figura 18) e como EMP (Efeito Máximo Possível) apresentado na Tabela 5.

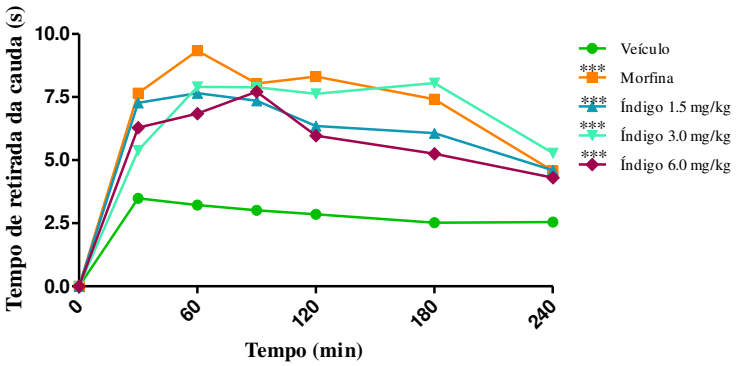


Figura 18 Efeito antinociceptivo do Índigo durante o teste de tail flick. Valores apresentados como média do tempo de latência para que o animal retire a cauda da fonte de calor. ANOVA seguida pelo teste de Tukey, **p< 0.001.

Tabela 5 Aumento da Latência causado pelo índigo no modelo de Tail flick durante as horas de observação. Valores expressos em % Efeito Máximo Possível (EMP).

Tempo de Observação min	EMP%				
	Veículo	Morfina	Indigo 1.5	Índigo 3.0	Índigo 6.0
0	---	---	---	---	---
30	7	66	61	30	44
60	3	90	66	68	52
90	0	72	62	68	65
120	-2	76	48	64	39
180	-8	63	44	70	28
240	-6	22	21	28	14

Os animais tratados com índigo apresentaram aumento do tempo de latência nas três doses testadas. As doses de 1.5 e 3.0 mg/kg de índigo mostraram valores de EMP de 66 % maior aos 60 minutos de experimento, e de 70 % aos 180 minutos de experimentação, respectivamente; a dose de 6.0 mg/kg de índigo apresentou aos 90 minutos um MPE de 65%. Todos os valores foram significativos quando comparados àqueles dos animais do grupo tratado com Veículo; já aqueles animais do grupo controle positivo Morfina

apresentaram um MPE de 90 % decorridos uma hora de experimento, mostrando-se muito mais eficaz que o índigo.

4.3.6. Modelo de Placa Quente

O modelo de placa quente avaliou o potencial analgésico, relacionado ao SNC, do índigo que mostrou-se ativo nesse modelo. A tabela 6 resume os resultados obtidos neste experimento expressos como média e dp do período de latência em segundos.

Tabela 6 Valores dos tempos de latência causados pelo índigo no modelo de placa quente. Valores expressos por média e desvio padrão Teste de ANOVA seguido de Tukey, *p<0.05; **p<0.01. Em comparação ao grupo Veículo.

Tempo de observação em minutos	Tempo de latência (s)				
	Veículo	**Morfina**	**Índigo 1.5**	**Índigo 3.0**	**Índigo 6.0**
30	5,3 ± 1,2	8,7 ± 2,2*	9,4 ± 3,2**	5,6 ± 2,3	4,5 ± 1,2
60	5,1 ± 0,7	8,8 ± 2,9*	8,8 ± 2,8*	5,2 ± 2,4	3,2 ± 0,87
90	3,5 ± 0,9	7,6 ± 1,9*	8,6 ± 3,0**	7,7 ± 4,6*	4,17 ± 1,3
120	4,0 ± 0,8	6,5 ± 1,4*	4,9 ± 0,9	5,9 ± 2,5	4,9 ± 1,6

Nesse modelo, a dose de 1.5 mg/kg apresentou um aumento de 77 % na latência na avaliação feita aos 30 minutos de experimento em comparação àquela realizada nos animais do grupo Veículo; na avaliação feita aos 60 minutos, a dose de 1.5 mg/kg apresentou 72 % de aumento da latência. Já na avaliação feita aos 90 minutos de experimentação, as doses de 1.5 e 3.0 mg/kg apresentaram aumento de latência de 145 e 120 %, respectivamente. Na avaliação realizada aos 120 minutos de experimento, apenas os animais do grupo controle positivo morfina apresentaram aumento significativo de 62 % no tempo de latência.

4.3.7. Teste de Formalina

Os dados resumidos nas figuras 19 e 20 indicaram que no modelo de formalina, o índigo reduziu o tempo de lambida nas patas apenas na segunda fase do modelo.

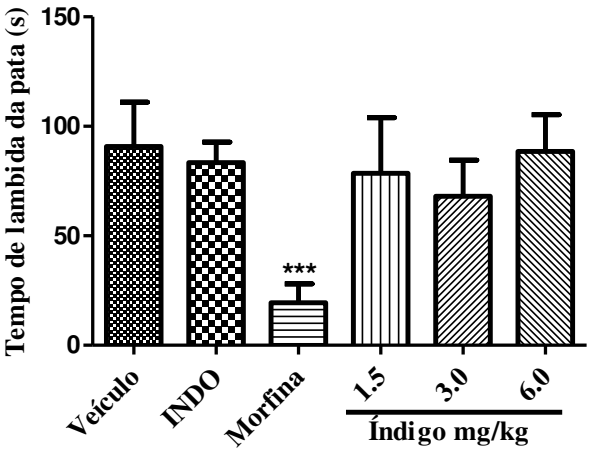


Figura 19 Efeito do índigo sobre a fase neurogênica do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey *** p< 0.001.

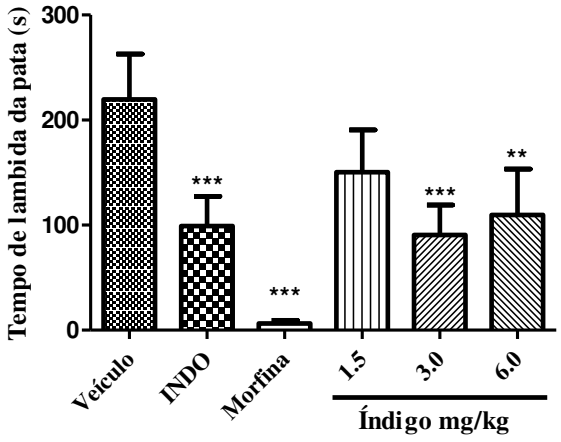


Figura 20 Ações do índigo sobre a fase inflamatória do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey, **p< 0.01 e *** p< 0.001.

Na primeira fase, aquela da dor neurogênica, apenas os animais do grupo controle positivo Morfina apresentaram inibição de cerca de 79 % do tempo de lambida em comparação aos animais tratados com o Veículo (dados apresentados na Figura 19). Já na segunda fase do modelo, que corresponde a dor inflamatória, os dados apresentados na Figura 20 mostram que os animais tratados com índigo apresentaram redução de 60 e 53% do tempo de lambida para as dose de 3.0 e 6.0 mg/kg, respectivamente, em comparação aos animais tratados com o Veículo. Os animais dos grupos controles positivos (Morfina e INDO) também apresentaram reduções estatisticamente significativas (***p< 0.001) em comparação aos do grupo Veículo; a Morfina produziu uma redução de 97% e a INDO de

56,4 %. Já o tratamento com índigo, na dose de 1.5 mg/kg, não apresentou redução estatisticamente significativa nesse modelo em ambas as fases.

4.3.8. Teste de Formalina com Reversão por Naloxona

O teste de formalina com reversão por naloxona teve o objetivo de avaliar uma possível interação do índigo com receptores opioides. Os dados obtidos estão expressos nas figuras 21 e 22.

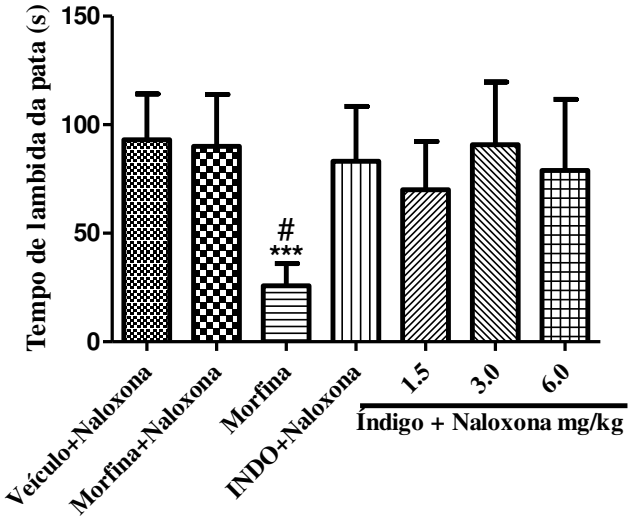


Figura 21 Efeito do índigo sobre a fase neurogênica do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey *** p< 0.001. # diferença significativa com a Morfina + Naloxona p<0.05.

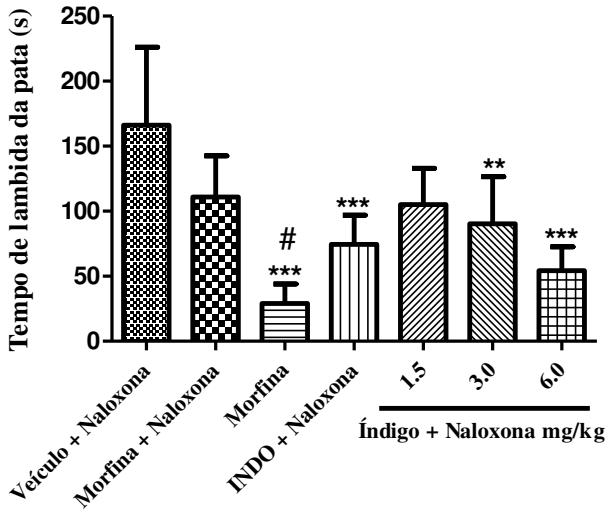


Figura 22 Efeito do índigo sobre a fase inflamatória do modelo de dor induzida por formalina. Valores expressos em media ± d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey** p<0.01 e *** p< 0.001; #p<0.05.

Na primeira fase apenas o grupo morfina sem naloxona apresentou reduções significativas do tempo de lambida da pata, em torno de 72 % quando comparado ao grupo Veículo; além disso, o grupo MORFINA apresentou diferença estatística (p<0.01) em relação ao grupo MORFINA com coadministração de naloxona (Figura 21). Já na segunda fase, aquela relacionada à dor inflamatória, o índigo apresentou redução significativa de 42

e 65 % para as doses de 3.0 e 6.0 mg/kg ($p<0.01$ e $p<0.001$), respectivamente, em comparação ao tempo dos animais do grupo controle Veículo (Figura 22). Os controles positivos utilizados, INDO e MORFINA sem naloxona, apresentaram 52 e 81 % de redução do tempo de lambida, respectivamente. Assim como na primeira fase os animais tratados com MORFINA também apresentaram diferença estatísticamente significante em relação aos animais tratados com MORFINA e naloxona.

4.3.9. Teste de Capsaicina

Nesse modelo os animais respondem ao estímulo de nocicepção causado pela capsaicina e os valores obtidos com os vários tratamentos estão apresentados na Figura 23.

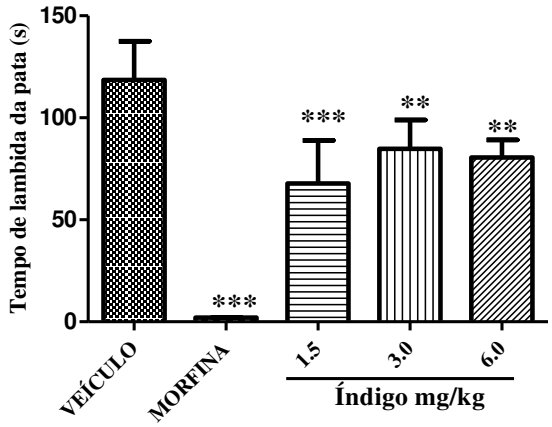


Figura 23 Efeitos do tratamento com índigo sobre a dor neurogênica no modelo de dor induzida por capsaicina. Valores expressos em media e d.p, ANOVA seguida por teste de Tukey $p< 0.01$ e *** $p< 0.001$.

As três doses do índigo (1.5, 3.0 e 6.0 mg/kg) apresentaram valores significativos de redução do tempo de lambida da pata de 40, 21 e 22 %, respectivamente. Já aqueles animais do grupo controle positivo MORFINA apresentaram redução de 98 % do tempo de lambida em comparação àqueles do grupo Veículo.

5. Discussão

A inflamação é uma resposta protetora normal e complexa dos tecidos vascularizados a danos ao organismo, que, quando não modulada adequadamente, tende a se cronificar. Em condições experimentais os modelos "*in vivo*" são utilizados na triagem de compostos anti-inflamatórios e analgésicos reproduzindo sinais e sintomas da resposta inflamatória, tais como edema, alteração da permeabilidade, infiltração de leucócitos, entre outros (Lapa *et al*., 2008). Dentre esses destacam-se: a) o edema de orelha induzido por xilol e ácido araquidônico, e o edema de pata induzido por carragenina; b) hiperalgesia induzida por carragenina; c) pleurisia induzida por carragenina e granuloma *cotton pellet* todos os modelos são uteis na investigação de alterações na permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos.

No edema induzido por xilol (Figura 1), um agente irritante que provoca ação inflamatória aguda com resultante edema devido à liberação de mediadores como histamina, serotonina e bradicinina e consequentemente aumento da permeabilidade vascular (Hosseinzadeh *et al.,* 2003), o índigo apresentou importante atividade antiedematogênica nas três doses empregadas. Alguns alcaloides já demonstraram essa atividade no modelo, como a vallesamina e scholaricina, metabólitos secundários encontrados na *Alstonia scholaris* (Apocinaceae) (Shang *et al.,* 2010).

O modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (Figura 2) é mediado através da biossíntese de eicosanóides como a prostaglandina (PGE_2), produto da ação da COX-2 (Rao *et al*., 1993). O tratamento com o índigo neste modelo apresentou redução significativa do edema nas três doses testadas, assim como a indometacina usada como controle positivo, um inibidor clássico da COX.

Os dados até então obtidos para o índigo nos edemas de orelha foram reforçados por aqueles do edema de pata induzido por carragenina, um modelo mais abrangente de inflamação. A carragenina, um polissacarídeo derivado de algas (gênero *Chondrus*), ao ser aplicada a receptores presentes no epitélio, especialmente o Toll like receptor 4 (TLR4); este, por sua vez, ativa o NF-κB que promove a liberação de citocinas e aumento da expressão de proteínas pró- inflamatórias, seguida pela infiltração de leucócitos caracterizando o processo inflamatório (Bhattacharyya *et al.,* 2008). O índigo, nas três doses estudadas, apresentou atividade significativa na redução do edema de pata produzido de 60 a 90 minutos após a injeção do polissacarídeo devido à liberação de histamina e bradicinina e, consequentemente, ativação da cascata de citocinas (TNF-α e IL-1β) (Torres *et al.,* 2000). Aos 120 minutos, acontece o máximo da resposta inflamatória desse modelo, com liberação de PGE_2 seguida de infiltração de leucócitos (Torres *et al.,* 2000); na segunda hora após carragenina tanto as 3 doses do índigo quanto a indometacina mantiveram-se ativas. Além disso, nas duas horas seguintes tanto o alcaloide quanto o controle positivo apresentaram redução do edema (Figura 3).

Outros alcaloides já demonstraram potenciais antiedematogênico nesse modelo como é o caso da sophocarpina, um alcaloide tetracíclico obtido de plantas do gênero *Sophora* (Papilionaceae) e a theacrina, alcaloide purínico da *Camilia Kucha* (Wang *et al.,* 2010). Assim, o índigo apresentou atividade sobre o edema tanto naquele que ocorre por liberação de histamina, serotonina e bradicinina que culminam com permeabilidade vascular, quanto naquele devido a efeitos sobre a cascata inflamatória na via da COX-2.

Nas técnicas de biologia molecular realizadas para avaliação da expressão da COX-2 em tecidos inflamados foi possível verificar que o índigo reduziu os níveis da enzima o

que contribuiu para a diminuição dos níveis de PGE_2, importante no processo inflamatório (Figura 4). A PGE_2 atua tanto perifericamente quanto no sistema nervoso; no cérebro, promove liberação de citocinas e aumento da expressão de receptores EP 1-4, seguido do quadro de febre, anorexia e depressão, induzindo um quadro clínico patológico conhecido como "comportamento doentio", muito comum em inflamações crônicas tais como colite ulcerativa e artrite reumatoide (Pecchi *et al*., 2009). Outra característica importante da PGE_2 é sua capacidade de sensibilizar nociceptores e induzir hiperalgesia; ao se aderir aos receptores EP_2, a PGE_2 promove influxo de Na^+ e fechamento dos canais de K^+, o que intensifica a resposta dolorosa durante sua transmissão (Harvey *et al* 2004 e Legler *et al.,* 2010). Matheus *et al*., (2007) estudaram o potencial da isatina um alcaloide isômero do precursor do índigo, obtidos das mesmas fontes; estes autores descobriram que a molécula reduziu os níveis de COX-2 em linhagem de macrófagos, o que poderia sugerir que redução na expressão da COX-2 seja característica em alcaloides indólicos derivados da *Indigofera*.

Mediadores inflamatórios como bradicinina, PGE_2, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contribuem para o processo de sensibilização dos nociceptores. Uma vez sensibilizados, os tecidos que recebem estímulos, geralmente inócuos em condições normais de homeostasia, acabam gerando resposta hipernociceptiva dolorosa (Chopade & Mulla, 2010). Baseado nesse princípio, o teste de Randall & Selitto reproduz a hipernocicepção na dor inflamatória. No decorrer do experimento, o grupo Veículo apresentou queda significativa do limiar de dor, em relação à avaliação basal. Essa diminuição não foi observada nos grupos tratados com índigo (doses de 3.0 e 6.0 mg/kg) que apresentaram um limiar significativamente maior quando comparados ao Veículo, além de não apresentarem diferença estatística em relação ao valor basal, o que também ocorreu para a indometacina (Tabela 4). Já o grupo tratado com morfina apresentou aumento do

limiar de dor em relação aos valores basais e seu efeito maior foi de 1 hora após aplicação de carragenina. A maior atividade das 3 doses do índigo ocorreu com duas horas após a aplicação do agente flogístico. Segundo Torres *et al*., (2000) a segunda hora após a aplicação de carragenina está vinculada à produção de PGE_2 seguida de infiltração de leucócitos, gerando o ápice da resposta inflamatória no edema. Desse modo, os resultados obtidos no modelo de hipernocicepção estão em concordância com aqueles obtidos no edema de pata, pois a maior atividade do índigo sempre ocorreu decorridas duas horas de administração do agente flogistico. Bianchi *et al*., (2007) observaram que testes que envolvem hipernocicepção promovem acúmulo de PGE_2 e TNF-α no fluído cérebro-espinhal e que drogas anti-inflamatórias, como nemisulida, apresenta boa resposta nesses modelos por reduzirem os níveis do prostanóide.

Com o propósito de melhor compreender o edema e compará-lo aos controles foi realizada uma análise histológica que avaliou qualitativamente o tecido inflamado da pata dos animais (Figuras 13 e 14). Nessas análises, foi evidenciado que o índigo nas doses empregadas, reduziu o edema e a infiltração leucocitária em comparação ao Veículo, assim como a indometacina. O mesmo não ocorreu para a morfina, em cujos tecidos aparecem áreas bem edemaciadas e presença acentuada de leucócitos. A diminuição desses dois parâmetros sugere que o alcaloide em estudo diminuiu hipernocicepção, mais por uma ação anti-inflamatória periférica do que por possível ação central.

Outro estudo qualitativo realizado foi o de COX-2 por imuno-histoquímica, em amostras de tecidos provenientes da pata dos ratos (Figura 15 e 16). O resultado qualitativo confirmou a atuação do alcaloide sobre a enzima. Os grupos tratados com índigo (3.0 e 6.0 mg/kg) apresentaram redução do edema, do infiltrado celular e marcação da enzima limitada aos vasos sanguíneos, enquanto o grupo Veículo + Carragenina apresentou edema

mais acentuado, seguido de infiltração de leucócitos e marcação positiva da COX-2 na matriz extracelular, indicando extravazamento plasmático. Deste modo, com a redução dos níveis de COX-2 houve redução nos níveis de PGE_2, confirmando o que foi anteriormente observado para o índigo no modelo edema de orelha induzido por AA.

Do mesmo modo, foi feita uma análise da COX-1 constitutiva que está distribuída por muitos órgãos e tecidos como estômago, rins e intestinos; já a COX-2 tem sua expressão aumentada sobre o processo inflamatório. A análise obtida mostrou que a indometacina, mas não o índigo, apresentou reduções significativas dos níveis da COX-1 (Figura 5) no tecido da orelha dos animais. Essa diferença de resposta entre as duas isoformas pode ser explicada através do núcleo celular. Enquanto a COX-1 é regulada por genes de manutenção (Sp1, Ap2 e NF-IL-6) e apresenta diversos elementos implicados em sua expressão constitutiva, a COX-2, por se tratar de uma enzima induzida, está implicada nos processos de inflamação e dor, sendo regulada por fatores de transcrição como o NF-κB (Murakami & Kudo, 2004). O fato do índigo não interferir nos níveis da COX-1 dá suporte aos resultados obtidos por Farias-Silva *et al*., (2007), onde os autores evidenciaram o potencial gastroprotetor e antioxidante do índigo. Deste modo, a não redução da isoforma constitutiva pode contribuir para a gastroproteção apresentada.

Desta maneira, as análises por western blot da unidade p65 foram realizadas para confirmar a atividade do índigo sobre o fator de transcrição de mediadores pró-inflamatórios; os resultados sugeriram que o composto reduziu, de modo significativo, os níveis da P65 em comparação aos do grupo Veículo, o que indica possível atividade sobre NF-κB (Figura 6). Essa atividade explicaria a redução dos níveis de COX-2, mas não naqueles de COX-1.

O NF-κB controla a expressão de genes envolvidos em respostas imune e de inflamação aguda, estresse oxidativo, adesão e diferenciação celular (Gilmore & Hercovitch, 2006). Esse fator de transcrição também está envolvido na produção de citocinas como TNF-α e IL- 1β. Em inflamações crônicas, NF-κB estimula o recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T para o sítio da inflamação (Barnes & Karin, 1997). Baseado nisso, a ação do índigo foi avaliada sobre outro parâmetro inflamatório, a infiltração leucocitária, em dois modelos experimentais, um agudo e outro crônico.

O teste de inflamação crônica do granuloma *cotton pellet*, inicialmente descrito por Swingle & Shideman (1972), avalia a infiltração de neutrófilos e macrófagos seguida por migração de fibroblastos (resposta de resolução) com formação de pequenos capilares que promovem irrigação sanguínea e formação de tecido fibroso devido à deposição de colágeno. Nesse modelo, as três doses do índigo e a dexametasona apresentaram uma diminuição da fase proliferativa (Tabela 2), além de redução do peso do *pellet* em comparação àquele do controle, tanto no *pellet* molhado, quanto no *pellet* seco; entretanto, nenhum dos tratamentos empregados de índigo apresentou diferença significativa entre si. Já o controle positivo dexametasona apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação com os grupos tratados com índigo. Tal diferença pode estar relacionada à formação do tecido fibroso que foi evidenciado ao redor dos *pellets* retirados dos grupos tratados com índigo e daqueles do Veículo, mas não naqueles retirados dos animais tratados com dexametasona. Essa diferença pode ser explicada pela não redução significativa pelo índigo em mononucleares no modelo de pleurisia induzido por carragenina. Uma característica importante dos macrófagos é a liberação de diversos fatores que contribuem

para a angiogênese e remodelamento de tecidos e dessa forma poderia explicar a formação do tecido fibroso presente no granuloma *cotton pellet* (Hasita *et al.,* 2010).

A pleurisia induzida por carragenina é um modelo utilizado para estudar infiltração celular em inflamação aguda. O modelo permite quantificar e correlacionar formação do exudato inflamatório e migração celular, além de alterações em outros mediadores inflamatórios (Li *et al*., 2011). Neste modelo, aplicação de carragenina induz produção de IL-1β e TNF-α; essas citocinas desempenham papel importante na sinalização e estimulação do NF-kB (Cuzzocrea *et al*., 2002); deste modo, há aumento da adesão das subunidades p65 e p50 ao núcleo celular e, com isso, ocorre aumento de enzimas pró-inflamatórias como a iNOS e COX-2 (D' Acquisito *et al*., 1999).

A presença desses mediadores pró-inflamatórios leva à ativação de leucócitos, principalmente neutrófilos, que se aderem à parede endotelial aumentando a permeabilidade vascular, o que dá continuidade ao processo inflamatório (Severino *et al*., 2009). O efeito do tratamento com as 3 doses do alcaloide índigo, neste modelo, confirmou a atividade anti-inflamatória sobre a infiltração celular encontrada anteriormente, uma vez que houve redução da infiltração celular total (Figura 7) e também o número de neutrófilos, embora esses resultados não tenham sido dose dependentes. Os neutrófilos são importantes no processo inflamatório, pois sua rápida ativação e migração para o sítio lesado contribui com a inativação do antígeno (Bratton & Henson, 2011).

Contudo, durante o processo inflamatório, os neutrófilos desempenham um papel danoso ao tecido, pois orquestram liberação de enzimas proteolíticas, de espécies reativas de oxigênio e peptídeos catiônicos junto ao sítio inflamatório o que acaba por gerar lesões teciduais (Sadik *et al*, 2011 e Fialkow *et al*., 2007). Além disso, espécies reativas de

oxigênio derivadas de polimorfonucleares promovem interrupção das junções endoteliais, induzem apoptose e necrose de células alveolares (Grommes & Soehnlein, 2011).

Deste modo, a redução de neutrófilos obtida nos grupos tratados com índigo mostrou-se um importante achado para sua atividade anti-inflamatória até então (Tabela 3). Com relação ao estresse oxidativo promovido por polimorfonucleares, ocorre participação de enzima MPO, que, após fagocitose do antígeno, é liberada pelos neutrófilos; a MPO está presente nos grânulos citoplasmáticos dessas células e tem papel importante por lisar bactérias (Klebanoff, 2005). O evento pelo qual a enzima atua é complexo; pois ocorre a formação de um sistema, no fagossomo celular, que envolve a presença da MPO, H_2O_2 (oriundo do "*burst* respiratório") e íon cloreto (Cl-). Esse sistema produz ácido hipocloroso e hipoclorito com potente ação microbicida ao oxidarem a membrana bacteriana (Malle et al., 2007).

No entanto, em doenças originadas por processos inflamatórios crônicos, como arteriosclerose, o ácido hipocloroso tem ação fundamental porque ele se liga a ester-fosfolipídios de membrana afetando a dinâmica celular, com consequente lise celular; como produto de tal atividade surge o 2- clorohexadecanal, um aldeído clorado com potente ação quimiotáxica, que promove mais recrutamento de neutrófilos presentes também em quadros de infarto do miocárdio e disfunções endoteliais (Thukkani *et al*., 2005 e Marsche *et al*., 2004). Assim, o papel do índigo na via da MPO foi estudado também no lavado pleural tendo sido observado que tanto o índigo, nas 3 doses empregadas, quanto a dexametasona, reduziram os níveis da enzima (Figura 8). Esses resultados são compatíveis com aqueles obtidos na contagem diferencial de neutrófilos, uma vez que muitos autores consideram que a MPO é um marcador de neutrófilos (Gordon *et al*., 2008).

Os resultados obtidos com o índigo em relação à redução dos níveis de MPO são condizentes com aqueles observados por Farias-Silva *et al*., (2007) onde os autores mostraram que o alcaloide reduziu níveis da enzima na mucosa gástrica confirmando a ação do índigo na enzima.

Outra espécie reativa com importante papel no processo inflamatório é o óxido nítrico proveniente da ação da iNOS; de maneira geral, a atuação da enzima está presente em células do sistema imune como em neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. Ao longo dos anos descobriu-se que hepatócitos, condrócitos e células messangiais também expressam essa enzima em quadros de inflamação (Muhl *et al*., 2011).

A partir da ação de citocinas (TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-17 e IL-22) ou mesmo por um mecanismo de retroalimentação envolvendo o NO ocorre estímulo do NF-κB (principalmente nas subunidades p65 e p50) e, dessa forma, o fator de transcrição promove expressão e liberação da iNOS. Bioquimicamente, a iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, com liberação de NO de livre difusão, que pode se combinar a radicais peróxido ou anion superóxido gerando radicais peroxinitrito altamente reativos (Muh *et al*., 2011 e Korhonen *et al.*, 2005). Macrófagos estimulados liberam pequenas quantidades de NO que resultam numa intensa produção de quimiocinas (MIP-2, MCP-1) dando continuidade à infiltração celular e ao processo inflamatório; quando ocorre estimulação da produção de NO por neutrófilos há resposta exacerbada que resulta em lesão tecidual (Kobayashi, 2010).

O teste colorimétrico de Griess avalia, de forma indireta, a quantidade de NO liberada durante o processo inflamatório e, em consequência, a atividade da iNOS, através da dosagem de nitrito (NO2-) e nitrato (NO3-). As três doses empregadas do índigo, assim como a dexametasona, produziram redução dos níveis de nitrito/ nitrato (Figura 9), o que

sugeriu possível atividade do alcaloide sobre a enzima iNOS, a partir de uma ação envolvendo redução da atividade do NF-κB, principalmente pela unidade p65 como foi observado anteriormente. Já era conhecido que a isatina, alcalóide indólico isômero do indol, reduziu os níveis de NO e iNOS em cultura de macrófagos (Matheus *et al.*, 2007), o que sugere, juntamente com os dados agora obtidos que essa classe de alcaloides pode realmente apresentar além da ação anti-inflamatória, ações antioxidantes adicionais envolvendo redução da iNOS.

Dentre os mediadores envolvidos no modelo de pleurisia por carragenina encontra-se o TNF- α; essa citocina tem funções biológicas como aumento da diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose (Chu, 2013). No entanto, TNF- α desempenha um papel imprescindível no processo inflamatório, pois em concentração aumentada estimula a ativação de genes pró-inflamatórios, morte celular e ativação de recrutamento de leucócitos para o sitio inflamatório; em alguns casos, sua alta secreção pode levar a choque séptico.

Os animais tratados com índigo na dose de 6.0 mg/kg, assim como aqueles tratados com dexametasona, apresentaram redução dos níveis de TNF- α em comparação àqueles do grupo tratado com Veículo (Figura 10); as análises realizadas por western blot do NF-κB apresentadas anteriormente mostraram que o índigo também reduziu sua expressão, o que poderia explicar a redução dos níveis de TNF- α, uma vez que o fator de transcrição está diretamente relacionado com a expressão da citocina. O TNF- α ainda estimula outras células (macrófagos, fibroblastos e células endoteliais) a secretarem potentes agentes quimiotáxicos como IL-8, um dos responsáveis pela infiltração neutrofílica. Outra participação importante do fator de necrose tumoral na migração celular deve-se à capacidade de estimular células endoteliais de vênulas adjacentes a produzirem integrinas e selectinas; essas proteínas medeiam fixação e rolamento de leucócitos no sangue.

Quimiocinas ativadas por TNF- α, no tecido adjacente, promovem ainda ativação leucocitária que secreta mais ligantes de integrinas, (Abbas, 2012). Desse modo, a redução do TNF- α explicaria a redução da infiltração de leucócitos encontrada no modelo de pleurisia. Spiller *et al.,* (2008) demonstraram que extratos de uma espécie de pimenta (*Capsicum bacatum*) rica em alcaloides tem capacidade de reduzir infiltração celular, e níveis de TNF-α e IL-1β.

A redução da expressão de COX-2 também é coordenada pelo NF-κB. A expressão de COX-2 foi analisada através de dois modos diferentes, western blot e imuno-histoquímica, novamente através da análise molecular em lavado pleural. Foi observado que os animais tratados com índigo nas doses de 3.0 e 6.0 mg/kg, assim como aqueles tratados com dexametasona, apresentaram redução na expressão da COX-2 (Figura 12). A redução dos níveis de PGE_2, analisado por teste de ELISA no lavado pleural confirmaram os achados de COX-2 (lavado pleural e edema de orelha induzido por ácido araquidônico) (Figura 11).

Outras células que tiveram sua infiltração reduzida pelo índigo no modelo de pleurisia foram os eosinófilos que são células há muito associadas às infecções alérgicas e parasitárias, participando tanto da resposta imune inata, quanto adaptativa através da liberação de vários mediadores inflamatórios como proteínas catiônicas e neurotoxinas derivadas de eosínofilos, além da eosinófilo-peroxidase (Fulkerson & Rothenberg 2013); em condições experimentais, eosinofília está presente em animais previamente sensibilizados com ovalbulmina (essa proteína estimula, de maneira seletiva, recrutamento de eosinófilos) caracterizando reação alérgica (Lloyd *et al.,* 2001). No modelo de pleurisia induzida por carragenina o tipo celular predominante é neutrófilo, também houve infiltração de eosinófilos. O índigo reduziu em mais de 50 % a infiltração eosinofílica no

lavado pleural nas 3 doses estudadas de modo semelhante à redução produzida pela dexametasona (Tabela 3). Alguns alcaloides como a warifteína derivada da *Cissampelos sympodialis* também produziram redução de eosinófilos em modelo de pleurisia alérgica, além de diminuírem a produção de leucotrienos (Bezerra- Santos *et al.,* 2006).

Outro tipo celular evidenciado na contagem diferencial realizada no lavado pleural foram os mononucleares, mais especificamente a presença de macrófagos; entretanto, de acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre o índigo e o Veículo. Apenas dexametasona reduziu significativamente esses mononucleares.

A dor é uma percepção subjetiva, desagradável e principalmente vital, na interpretação da presença de estímulos nocivos ao organismo. Ligada em múltiplos níveis com o processo inflamatório, a dor é um dos seus cinco sinais cardinais, embora não seja o único tipo existente (Medzhitov, 2010 e IASP, 1986).

Dentre os diferentes modelos de nocicepção encontra-se o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A complexidade do teste foi bem caracterizada por Ribeiro *et al.,* (2000); de acordo com seus experimentos a administração do agente flogístico ativa macrófagos residentes e mastócitos causando, na cavidade abdominal, a liberação de mediadores inflamatórios que atuam indiretamente no fluído peritonial provocando liberação de mediadores endógenos que incluem bradicinina, substância P, PGE_2 e citocinas, todos eles responsáveis por sensibilização de neurônios aferentes (Franzotti *et al,.* 2002). O índigo, nas 3 doses empregadas, apresentou atividade antinociceptiva estatisticamente significativa em reduzir o número de contorções abdominais, quando comparado ao Veículo (Figura 17). A indometacina também apresentou atividade nesse modelo. Assim sendo, provável que a redução do número de

contorções esteja envolvida com diminuição dos níveis de PGE_2 e TNF-α, como descrito por Franzotti *et al.* (2002).

O teste de *tail flick*, se baseia na estimulação térmica de nociceptores presentes na cauda do animal. A dor produzida neste modelo é reduzida por drogas de ação central. Com o calor acima de 43° C ocorre excitação de nociceptores termossensíveis que culmina com um vigoroso movimento da cauda do animal (Le Bars *et al.,* 2001). As 3 doses empregadas do índigo, bem como a morfina (controle positivo) reduziram a dor no modelo de *tail flick*; no entanto o opiáceo mostrou-se mais eficaz já na primeira hora (Figura 18 e Tabela 5). A ação do índigo no modelo de *tail flick* pode estar intimamente ligada à participação dos TRPV1; os quais desempenham papel fisiológico primário na transdução da dor mediante estímulos químicos e térmicos (Mandadi & Roufogalis 2008). Estudos com neurônios em meio de cultura mostraram que os receptores TRPV1 são ativados após serem expostos a uma temperatura aproximada de 43° C (Bausbaum *et al.*, 2009).

O modelo de placa quente é outro teste de dor que envolve estímulos térmicos mediante a ativação de receptores serotonérgicos, colinérgicos. Um provável bloqueio desses receptores pode induzir a sensação analgésica. Os dados complementam o que foi apresentado no teste de *tail flick*, no modelo de placa quente onde a morfina se mostra bastante ativa, já aos 30 minutos, em aumentar o tempo de latência ao estímulo térmico, somente a menor dose de índigo (1.5 mg/kg) apresentou efeitos semelhantes aos da morfina (Tabela 6) sobre o tempo de latência, mas tais efeitos foram menos duradouros.

Os mecanismos analgésicos do índigo foram também analisados no teste de formalina que envolve duas fases com respostas distintas (Figura 19 e 20). A primeira fase ocorre bem rapidamente e é mais sensível a anestésicos como a lidocaína e a fármacos opioides. Isso se deve à dor exclusivamente neurogênica com excitação de fibras nervosas

Aδ mielinizadas e fibras C não mielinizadas (Mcnamara *et al.,* 2007). Nela, apenas o controle positivo morfina apresentou antinocicepção, o que era esperado já que essa droga atua no receptor opioide μ bloqueando a transmissão do impulso nervoso pré e pós sinapticamente, impedindo a liberação de neurotransmissores através das fibras nervosas aferentes primárias (Trafton *et al*., 1999). Embora o índigo, nas 3 doses empregadas, não tenha apresentado efeito, alguns alcaloides como laetispicina, obtida da *Piper laetispsicum* (Piperaceae), apresentou redução da dor neurogênica (Yao *et al*., 2009) no mesmo modelo.

A segunda fase, mais tardia do teste de formalina envolve um período de sensibilização dos nociceptores por parte dos mediadores inflamatórios (serotonina, histamina e PGE_2) liberados em resposta à lesão tecidual (Tjølsen *et al.,* 1992). Por tratar-se de um modelo em que o estímulo da dor ocorre de maneira periférica, DAINES atuam nessa fase do modelo. Na fase inflamatória do teste, as doses de 3.0 e 6.0 mg/kg de índigo reduziram o tempo de lambida da pata dos animais, do mesmo modo que a indometacina usada como controle positivo. O resultado sobre a segunda fase aponta para um possível efeito analgésico do índigo devido a sua ação anti-inflamatória. Entretanto, não se pode afirmar que o índigo não apresente efeito sobre o sistema nervoso central por ação opioide, já que alguns autores acreditam que a segunda fase, a dor inflamatória, seja uma resposta desencadeada em detrimento da primeira fase ou aquela da dor neurogênica (Le Bars *et al.,* 2001).

Após serem realizados modelos de dor que avaliam interação de drogas que bloqueiam a dor neurogênica, o teste de formalina com reversão por naloxona foi empregado com o intuito de estudar possíveis ações inibitórias do índigo em receptores opioides. É sabido que naloxona, um antagonista opioide, apresenta afinidade para os três tipos de receptores (μ, κ e δ), e que essa droga bloqueia os efeitos de substâncias com ações

semelhantes às da morfina (Figura 21 e 22). Por essa razão, naloxona tem sido muito empregada em experimentação no sentido de determinar o papel fisiológico de novas drogas na transmissão da dor (Rang & Dale, 2008). Nesse modelo, todos os grupos (exceto um grupo controle morfina) foram pré-tratados com naloxona e foi observado que o antagonista conseguiu reverter o potencial analgésico da morfina nas duas fases da dor (quando a comparação foi feita entre Morfina + Naloxona e apenas Morfina); entretanto, quando o índigo foi comparado ao grupo Veículo, ele novamente apresentou redução do tempo de lambida na segunda fase, aquela que envolve dor inflamatória repetindo o que foi observado no modelo de formalina sem naloxona. Esse resultado indicou que a naloxona não reverteu a analgesia produzida pelo índigo, sugerindo que o alcaloide não apresenta mecanismo de ação relacionado a receptores opioides. Por último, os resultados obtidos para o índigo no modelo de formalina com reversão por naloxona não explicaram por que o alcaloide se mostrou ativo em modelos de dor envolvendo o sistema nervoso central.

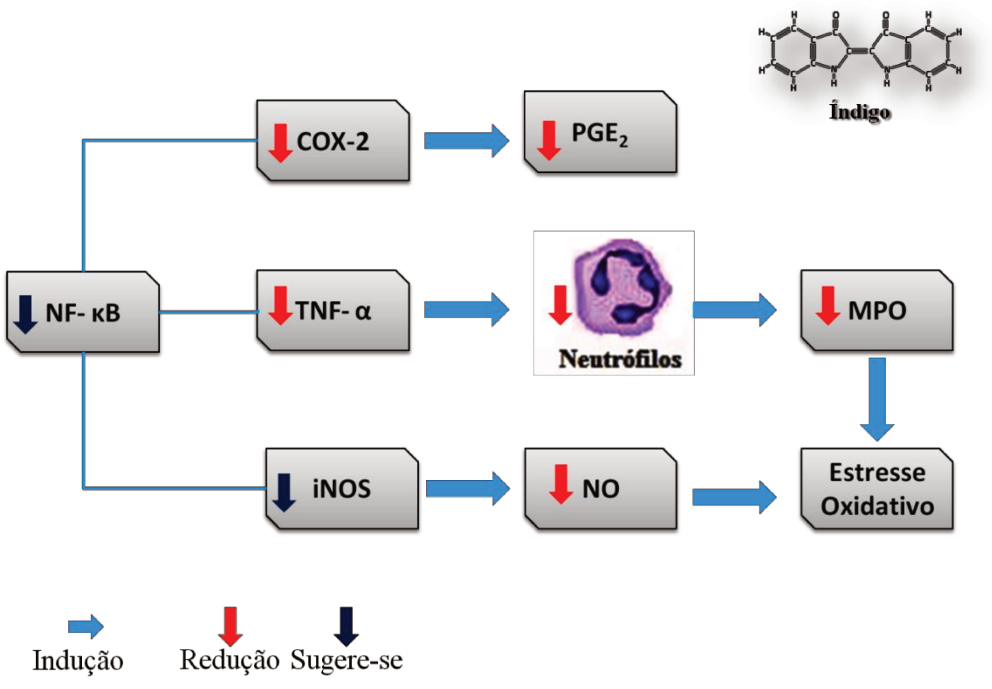
Com a finalidade específica de responder essa questão o teste de capsaicina foi realizado para avaliar se a nocicepção exibida pelo índigo ocorre por interação com receptores TRPV1. A capsaicina, presente nas pimentas do gênero *Capsicum,* excita seletivamente terminações nervosas; esse efeito acontece porque o agente flogístico se liga a receptores vanilóides, além de estimular a produção de NO e também de glutamato promovendo liberação de SP; esse mecanismo facilita a sensibilização do corno dorsal durante a hiperalgesia (Bausbaum *et al*., 2009). Nesse modelo, as três doses índigo apresentaram redução da dor em comparação ao Veículo (Figura 23), sugerindo possível interação do composto em estudo com os receptores TRPV1. Receptores vanilóides não respondem apenas aos agonistas como a capsaicina, mas também a outros estímulos como temperatura excessiva (Mandadi & Roufogalis, 2008). Sendo assim, os resultados positivos

obtidos para o índigo no teste de capsaicina podem explicar também aqueles obtidos nos testes de tail flick e placa quente, ou seja, a antinocicepção produzida pelo índigo parece ser via inibição dos TRPV1.

Os resultados ao longo do trabalho indicam que o índigo apresenta uma ação anti-inflamatória e analgésica, muito provavelmente por sua inibição com mediadores inflamatórios via COX-2 e NF-κB, além de antagonismo aos receptores TRPV1, respectivamente do que propriamente com receptores opioides. O conjunto de resultados abre a possibilidade para o estudo e pesquisa das ações do índigo em modelos clássicos envolvendo doenças inflamatórias crônicas.

6. Conclusões

Ao longo de todo o trabalho, o índigo foi estudado no que diz respeito ao processo inflamatório (formação de edema e infiltração celular) e dor de origem neurogênica e inflamatória. Através de modelos clássicos de inflamação pode ser evidenciada a redução de edema e da infiltração de leucócitos, principalmente polimorfonucleares. Um estudo mais minucioso apontou para a redução de mediadores inflamatórios regulados pelo NF-κB que estão envolvidos na gênese da dor inflamatória e também no estresse oxidativo (de acordo com o fluxograma abaixo). Outro aspecto importante observado foi a diminuição da dor em alguns modelos clássicos de nocicepção, além de aumento de latência em outros. De acordo com os dados obtidos é provável que o índigo tenha seu efeito analgésico mais voltado para os mediadores inflamatórios do que propriamente para uma ação analgésica central como aquela da morfina.



Fluxograma 2 Esquema resumido da atividade do índigo durante o trabalho. Seta azul clara indução, seta vermelha redução observada nos tratamentos com índigo e seta azul escura possível ação do índigo.

7. Perspectivas

A redução de eosinófilos no modelo de pleurisia indicou que o índigo poderia ter atividade nesse tipo celular, em vista disso com o objetivo de confirmar essa atividade, foi realizado o modelo de asma induzido por ovalbulmina. Nesse modelo, o índigo diminuiu o infiltrado celular no modelo induzido por OVA (dados em anexo). Esse resultado propicia novos horizontes para estudo com o alcaloide índigo em processos inflamatórios crônicos, como asma e artrite reumatoide, na busca por uma nova droga.

Outra importante perspectiva é o aprofundamento dos estudos do alcaloide em modelos de dor, uma vez que diversos mediadores e receptores estão envolvidos nesse processo fisiológico e trata-se de um campo de pesquisa vasto em que o índigo pode ser promissor como um novo candidato a fármaco.

Referências Bibliográficas

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. Imunologia Celular e Molecular, 7ª edição. Ed. Saunders Elsevier, 2012 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Abraham, S.N., St John, A.L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat Rev Immunol**. V.10, p.440-452, 2010.

Adachi, J.D., Bensen, W.G., Hodsman, A.B. Corticosteroid- induced osteoporosis. **Semin Arthrits Rheum**. V. 22, p. 375-384, 1993.

Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.** V.1000, p. 40-56, 2004.

Amann, R., Peskar, B.A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate**. Eur J Pharmacol**. V. 447, p 1-9, 2002.

Asarch, A., Gottlieb, A.B., Lee, J., Masterpol, K.S., Scheinman, P.L., Stadecker, M.J., Massarotti, E.M., Bush, M.L. Lichen, planuslike eruptions: an emerging side effect of tumor necrosis factor-α antagonists. **J Am Acad Dermatol**. V. 61, p.104–111, 2009.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** V. 139, p. 267-84, 2009.

Bauer, J., Naminemi, S., Reisinger, F., Zöller, J., Yuan, D., Heikenwälder, M. Lymphotoxin, NF-κ B, and Cancer: The Dark Side of Cytokines. **Dig Dis**. V. 30, p.453-468, 2012.

Barnes, P.J. Future therapies for chronic obstructive pulmonary disease. **Br J. Pharmacol**. V. 148, p. 245-254. 2006.

Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**. V. 336, p. 1066-1071, 1997.

Bhattacharyya, S., Gill, R., Chen, M.L., Zhang, F., Linhardt, R.J,, Dudeja, P.K., Tobacman, J.K.. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10- NF kappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells**. J Biol Chem**. V.18, p.283 - 316, 2008.

Bezerra-Santos, C.R., Vieira-de-Abreu, A., Barbosa-Filho, J.M., Bandeira-Melo, C., Piuvezam, M.R., Bozza, P.T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int Immuno pharmacol**. V. 6, p.1152–1160, 2006.

Bianchi, M., Martucci, C., Ferrario, P., Franchi, S., Sacerdote, P. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2 concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs. **Anesth Analg**. V. 104, p. 949- 954, 2007.

Bilate, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**. V. 8, p. 47- 51, 2007.

Bortoluzzi, R.L.C., Garcia, F.C.P., Carvalho-Okano, R.M., Tozzi, A.M.G.A., Leguminosae-papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce I: Trepadeiras e Subarbustos. *Iheringia.* **Série Botânica**, V. 58, p. 25-60, 2003.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. V. 72, p. 248-254, 1976.

Branford, R., Droney, J., Ross, J.R. Opioid genetics: the key to personalized pain control?. **Clin Genet**. V.82 , p. 301-310, 2012.

Bratton, D.L., Henson, P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends Immunol**. V. 32, p.350-357, 2011.

Calil, A.M., Pimenta, C.A.M. Intensidade da dor e adequação de analgesia. **Rev Lat-am Enf**. V. 13, p. 692-699, 2005.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**. V. 33, p.179-189, 2000.

Calixto, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos**. Ciência e Cultura**. V. 55, p. 37-38, 2003.

Calvo, T.R. Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). **Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.** Araraquara/ SP, 2007.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA.** V. 72, p. 3666-3670. 1975.

Chang, H.N., Pang, J.H., Yang, S.H., Hung, C.F., Chiang, C.H., Lin, T.Y., Lin, Y.K. Inhibitory effect of indigo naturalis on tumor necrosis factor-α-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. **Molecules**. V. 15, p. 6423-6435, 2010.

Chopade, A.R., Mulla, W.A. Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **Eur J. Clin Pharmacol**. V. 66, p. 429-444, 2010.

Chou, R., Helfand, M., Peterson, K., Dana, T., Roberts, C. Drug Class Review on Cyclo-oxygenase (COX)-2 Inhibitors and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)**: Final Report Update 3 [Internet]. Portland (OR): Oregon Health & Science University, 2006**.

Chu, W.M., Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**. V. 328, p. 222–225, 2013.

Cipriano, A., de Almeida, D.B., Vall, J., Profile of chronic pain patients seen in a pain outpatient setting of a major Southern Brazil' city. **Rev Dor**. V.12, p. 297-300. 2011

Cola, M. Atividade antiulcerogênica de plantas nativas do cerrado do estado de são paulo - pertencentes ao gênero indigofera. **Tese de doutorado pela Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP**, Campinas/ SP, 2006.

Cola-Miranda, M., Barbastefano, V., Hiruma-Lima, C.A., Calvo, T.R., Vilegas, W., Souza Brito, A.R.M., Antiulcerogenic activity of Indigofera truxillensis Kunth. **Biota Neotropica.** V.6, (n3). 2006

Cragg, G.M., Newman, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1830, p. 3670–3695, 2013.

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. **J. Leukoc Biol.** V.83, p. 824-832. 2008.

Cuzzocrea, S., Bruscoli, S., Crisafulli, C., Mazzon, E., Agostini, M., Muia, C., Esposito, E., Di Virgilio, R., Meli, R., Vegeto, E., Maggi, A., Riccardi, C. Estrogen receptor antagonist fulvestrant (ICI 182,780) inhibits the anti-inflammatory effect of glucocorticoids**. Mol Pharmacol**. V. 71, p. 132-44, 2007.

Cuzzocrea, S., Chatterjee, P.K., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A.P., Thiemermann, C. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **Br J Pharmacol**. V. 135,,p. 496-510, 2002.

D'Acquisto, F., Ialenti, A., Ianaro, A., Carnuccio, R. Nuclear factor-kappaB activation mediates inducible nitric oxide synthase expression in carrageenin-induced rat pleurisy. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. V.360, p.670-675 1999.

De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J., Velloso, L. A. Consumption of a fat-rich diet activates a pro-inflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology.** V. 146, p. 4192-4199, 2005.

Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A. Trp ion channels and temperature sensation. **Annu Rev Neurosci.** V.29, p.135-161, 2006.

Dinarello, C.A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **J Exp Med**. V. 201, p. 1355-1359, 2005.

Dostert, A., Heinzel, T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. Curr Pharm Des .V.10, p. 2807-2816, 2004.

Duarte, F.D. Opium and Opioids: A Brief History. **Rev Bras Anestesio**. V. 55, p. 135 – 146, 2005.

Eddy, N.B., Leimbark, D. Synthetic anlgesics II. Dithienylbutenil and dithienilbutylamines. K. Pharmacology. **Exp. Ther**, V. 107. p. 385-393, 1953.

Farias-Silva, E. Cola, M. Calvo, T.R. Barbastefano, V. Ferreira, A.L. De Paula Michelatto, D. Alves de Almeida, A.C. Hiruma-Lima, C.A. Vilegas, W. Brito, A.R. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. **Planta Med**. V. 73, p. 1241-1246, 2007.

Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med**. V.42 p.153-164, 2007.

Flower, R.J. The development of COX - 2 inhibitors. **Nature Reviews**. V. 2, p. 179-191, 2003.

Franzotti, E.M., Santos, C.V.F., Rodrigues, H.M.S.L., Mourão, R.H.V., Andrade, M.R., Antoniolli, A.R. Anti-inflammatory, analgesic and acute toxicity of *Sida cardiafolia* L. **J. Ethnopharmacol**. V. 72, p. 273-278, 2002.

Fröde-Saleh, T.S, Calixto, J.B. Synergistic anti-inflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal anti-inflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. **Inflamm Res**. V. 49, p.330-337, 2000.

Fulkerson, P.C., Rothenberg M.E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nature reviews drug discovery**. V.12, p. 117-129, 2013

Gali, J.C., Caetano, E.B., Santoro, A.G. As Infiltrações são mesmo prejudiciais?. **Rev. Bras Ortop**. V. 35, p. 173-178, 2000.

Gilmore, T.D., Herscovitch, M. Inhibitors of NF-jB signaling: 785 and counting. **Oncogene**. V.25, p. 6887–6899, 2006.

Gilroy, D.W., Newson, J., Sawmynaden, P., Willoughby, D.A., Croxtall, J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation**. FASEB J**. V. 18, p. 489-498, 2004.

Gordon, J.S., Wolanin, P.M., Gonzalez, A.V., Fela, D.A., Sarngadharan, G., Rouzard, K., Perez, E,, Stock, J.B., Stock, M.B. Topical N-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine inhibits mouse skin inflammation, and unlike dexamethasone, its effects are restricted to the application site. **J Invest Dermatol**. V. 128, p. 643-654, 2008.

Grommes, J., Soehnlein, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Mol Med**. V.17 p.293-307, 2011.

Harvey, R.J., Depner, U.B., Wässle, H., Ahmadi S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O.M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D.P., Betz, H., Zeilhofer H.U., Müller, U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. **Science.** V. 304, p. 884—887, 2004.

Hasita, H., Komohara,Y., Okabe, H., Masuda,T., Ohnishi,K., Lei,X.F., Beppu, T., Baba, H., Takeya, M. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Sci**. V. 101, p. 1913-1919, 2010.

Henriques, A.T.; Limberger, R.P.; Kerber, V.A.; Moreno, P.R.H. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed.; Simões, C. M. O. et al., Eds. Editoras of the Universidades Federais de Santa Catarina and Rio Grande do Sul: Porto Alegre/Florianópolis, Brazil, 2004; Chapter 29, pp. 765-792.

Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, AB, Rothenberg, M.E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin Exp Allergy**. V.38, p.709-50, 2008.

Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M.H., Arash, A.R. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of Salvia leriifolia Benth seed extract in mice and rats**. Phytother Res**. V.17, p.422-425, 2003.

Hunskaar, S., Hole, K.. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. V.1, p.103-114, 1987.

IASP. Classification of chronic pain. 1986; Suppl 3. p. 1-26

Jessel, T.M., Kelly D.D. Pain and Analgesy in**: Principles of Neural Science 3 ed**. Kandell E.R Schwarts, J. H Jessel, T.M Elsevier 1991, p. 385-399.

Kalinski, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E_2**. J. Immunol**. V. 188, p.21-28, 2012.

Khanna, D., Sethi, G., Ahn, K.S., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., Aggarwal, A., Aggarwal, B.B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment.**Curr Opin Pharmacol**. V.7, p. 344-351, 2007.

Kieffer, B.L., Gavériaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. **Prog Neurobiol**. V.66p.285-306, 2002.

Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**. V.77, p. 598–625, 2005.

Kobayashi ,Y.. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **J. of Leukocyte Biol**. V.88 p. 1157- 1162, 2010.

Kobayashi, Y. The nociceptive and anti-nociceptive effects of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa* in mice. **Planta Med.** V.69, p.425- 428, 2003.

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Cur Drug Targets - Inflammation & Allergy**. V. 4, p. 471-479, 2005.

Koster, R., Anderson, M. De Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc**. V. 18, p. 412 - 421, 1959.

Kummer, C.L., Coelho, T.C. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brás Anestesiol**. V. 52, p. 498-512, 2002.

Küpeli, E., Kosar, M.,Yesiladaa,E., Baser, K.H.C., Baser, C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish Berberis species. **Life Sciences**. V.72, p. 645-657, 2002

Lapa, A.J., Souccar, C., Lima-Landman, M.T.R., Castro, M.S.A., De Lima, T.C.M. **Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica.** SBPC Campinas 2008.

Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. V.40, p. 389-430, 2000.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**. V. 2, p.787-795, 2002.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**. V.53, p. 597-652, 2001.

Lee, M., Tracey, I. Neuro-genetics of persistent pain. **Curr Opin Neurobiol**. V.23, p.127-132. 2013

Legler, D.F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E., Krause, P. Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. **Int J Biochem Cell Biol**. V. 42, p. 198-201, 2010.

Li, Z.P., Hu, J.F., Sun, M.N., Ji, H.J., Zhao, M., Wu, D.H., Li, G.Y., Liu, G., Chen, N.H. Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Eur J Pharmacol.** V. 661, p.118-23, 2011.

Little, R.J, Bodor, N., Loftsson, T. Soft drugs based on hydrocortisone: the inactive metabolite approach and its application to steroidal antiinflammatory agents. **Pharm Res**. V. 16, p. 961-967, 1999.

Lloyd, C.M., Gonzalo, J.A., Nguyen, T., Delaney, T., Tian, J., Oettgen, H, et al. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-3 and tissue leukocyte apoptosis. **J Immunol**. V.1662, p.033–40.2001.

Luiz-Ferreira, A., Cola, M., Barbastefano, V., de-Faria, F.M., Almeida, A.B., Farias-Silva, E., Calvo, T.R., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W., Souza-Brito, A.R. Healing, Antioxidant and Cytoprotective Properties of Indigofera truxillensis in Different Models of Gastric Ulcer in Rats. **Int J Mol Sci**. V.13, p.14973-14991. 2012

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. Proc Natl Acad Sci U S A. V.104, p.13525-13530, 2007.

Malle, E., Furtmüller, P.G., Sattler, W., Obinger, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. **Br J. Pharmacol**. V. 152, p.838-854, 2007.

Mandadi, S., Roufogalis, B.D. ThermoTRP channels in nociceptors: taking a lead from capsaicin receptor TRPV1. **Curr Neuropharmacol**. V.6, p. 21-38, 2008.

Marsche, G., Heller, R., Fauler, G., Kovacevic, A., Nuszkowski, A., Graier, W. 2-Chlorohexadecanal derived from hypochlorite modified high-density lipoprotein-associated plasma logen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. V. 24, p. 2302–2306, 2004.

Mazzon E, Esposito E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Genovese T, Caminiti R, Meli R, Bramanti P, Cuzzocrea S Effect of tumour necrosis factor-alpha receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. **Clin Exp Immunol**. V.153, p.136-149, 2008.

Matheus, M.A., Violante, F.A., Garden, S.J., Angelo C. Pinto, A.C., Fernandes, P.D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **Eur J. of Pharmacol.** V.556, p. 200–206, 2007.

Maugard, T. Enaud, E. Choisy, P. Legoy, M.D. Identification of an indigo precursor from leaves of Isatis tinctoria (Woad). **Phytochemistry**. V. 58, p. 897-904. 2001.

Medeiros, A., Peres-Buzalaf, C., Verdan, F.F., Serezani, C.H.. Prostaglandin E2 and the Suppression of Phagocyte Innate Immune Responses in Different Organs. **Mediators of Inflammation**, EPUB- 2013

Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**. V.140, p.771-776. 2010

Mikami, T., Miyasaka, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. Eur **J Pharmacol.** V.95, p. 1-12, 1983.

Moreira, J.L.A. & Tozzi, A.M.G.A. 1997. Indigofera L. (Leguminosae, Papilionoideae) no estado de São Paulo. **Rev Bras Bot**. V. 20, p. 97-117, 1997.

Mühl, H., Bachmann, M., Pfeilschifter, J. Inducible NO synthase and antibacterial host defence in times of Th17/Th22/T22 immunity. **Cell Microbiol**. V. 13, p. 340–348, 2011.

Murakami, M., Kudo, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. **Prog Lipid Res**. V. 43, p. 3-35. 2004.

Nathan, C., Ding A. Nonresolving Inflammation. **Cell.** V. 140, p. 871–882, 2010.

Ness, T.J, Gebhart, G.F. Centrifugal modulation of the rat tail flick reflex evoked by graded noxious heating of the tail. **Brain Res**. V. 386, p. 41-52, 1986.

Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from1981 to 2010. **J. Nat. Prod**. V. 75, p. 311−335, 2012.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Natural products as sources of New Drugs over the 25 years. J.**Nat prod**. V.70, p. 461-477, 2007.

Niedeberger, E., Geisslinger, G. The IKK-NF-B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy?. **The FASEB journal**. V. 22, 3432-3442, 2008.

Olesen AE, Andresen T, Staahl C, Drewes AM. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. **Pharmacol Rev**. V. 64, p. 722-779, 2012.

Panthong A, Kanjanapothi D, Thitiponpunt Y, Taesotikul T, Arbain D. Anti-inflammatory activity of the alkaloid bukittinggine from *Sapium baccatum*. **Planta Med**. V. 64, p. 530-535, 1998.

Peakman, M., Vergani, D. **Imunologia básica e clínica**. 2ª Edição. Cap. 3, p.23-33. 2011

Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S, Troadec JD. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiol Behav**. V. 97, p. 279-292, 2009.

Pleuvry, B.J., Lauretti, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther.** V.71, p. 313-24, 1996.

Pokharel, Y. R., Yang, J. W., Kim, J. Y. , Oh, H. W, H.G., Jeong, E.R. Woo, E.R., Kang, K. W. Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. **Nitric Oxide Bio and Chem**. V. 15, p. 217-225, 2006.

Polito, A., Aboab, J., Annane, D. Adrenal Insufficiency in Sepsis. **Rev Bras Ter Int**. V. 18, p. 86-94, 2006.

Randall, L.O., Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue**. Arch Int Pharmacodyn Ther.** V.111, p. 409-419. 1957.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. Farmacologia 6° Edição. 2008.

Rao, T.S., Currie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation.** V.1, p.723-741, 1993.

Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B.P., Poole,S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. Eur. J. Pharmacol. V.387, p.111–118, 2000.

Roig, J.T. **Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba,** La Havana: Editorial, Cientifica Tecnica 1988.

Rouzer, C.A., Marnett, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J Lipid Res**. V.50, p. 29-34, 2009

Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-No, K., Sakurada, S., Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**. V.31, p.1279–85, 1992.

Sadik, C.D., Kim, N.D., Luster, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol.** V.32 p. 452-60, 2011.

Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L., Basbaum, A.I. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. **Cell.** V.137, p.1148-1159, 2009.

Serhan, C.N, Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**. V.6, p. 1191-1197, 2005.

Severino, D.N., Pereira, R.L., Knysak, I., Cândido, D.M., Kwasniewski, F.H. Edematogenic activity of scorpion venoms from the Buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. **Inflammation**. V.32 p. 57-64, 2009.

Schiantarelli, P., Cadel, S., Acerbi, D. & Pavesa. Anti-inflammatory activity and bioavailiabily of percutaneous piroxican. **Arzneim. Forsch/ Drug Research**. V. 32, p. 230-235, 1982.

Shang JH, Cai XH, Feng T, Zhao YL, Wang JK, Zhang LY, Yan M, Luo XD. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects.**J Ethnopharmacol**. V.129, p.174-181, 2010.

Silman, A.J., Pearson, J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**. V.4, p.265–272, 2002.

Sousa Falcão, H. Leite, J.A. Barbosa-Filho, J.M. De Athayde-Filho, P.F. De Oliveira Chaves, M.C. Moura, M.D. Ferreira, A.L. De Almeida, A.B. Souza-Brito, A.R. De Fátima Formiga Melo Diniz, M. Batista, L.M. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review**. Molecules**. V.17, p. 3198- 3223, 2008.

Spiller F., Allves M.K., Carvalho T.A., Leite C.E., Lunardelli A., Poloni J.A., Cunha F.Q., De Oliveira J. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **J. Phrama Pharmacol**. V. 60, p. 473 – 478, 2008.

Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel,I., Watkins, S.K., Suttles, J. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences**. J. Immunol**. V. 175, p.342-349, 2005.

Swingle, K.F. & Shideman, F.E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and their modification by certain anti-inflamatory drugs. **J. Pharmacology. Exp. Ther**. V.183, p. 226-234, 1972.

Teixeira, M.J, O**. Anatomia e Fisiologia das vias nociceptivas da dor**. Dor epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. Ed Moreira Jr. 1 ed. 2001

Torres, S.R., Fröde, T.S., Nardi, G.M., Vita, N., Reeb, R., Ferrara, P., Ribeiro-do-Valle, R.M., Farges, R.C. Anti-inflammatory effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands in two mouse models of inflammation. **Eur J Pharmacol**.V. 408 p.199-211, 2000.

Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. V. 51, p. 5-17, 1992.

Thukkani, A.K., Martinson, B.D., Albert, C.J, Vogler, G.A., Ford, D.A. Neutrophil-mediated accumulation of 2-ClHDA during myocardial infarction: 2-ClHDA-mediated myocardial injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. V.288, p. 2955–2964, 2005.

Trafton, J.A., Abbadie, C., Marchand, S., Mantyh, P.W, Basbaum, A.I. Spinal opioid analgesia: how critical is the regulation of substance P signaling? **J Neurosci**. V. 19, p. 9642-9653, 1999.

Viegas, C. Jr, Alexandre-Moreira, M.S., Fraga, C.A., Barreiro, E.J., Bolzani, V. S., de Miranda, A.L. Antinociceptive profile of 2,3,6-trisubstituted piperidine alkaloids: 3-O-acetyl-spectaline and semi-synthetic derivatives of (-)-spectaline. **Chem Pharm Bull** (Tokyo). V. 56, p.407-412, 2008.

Vonkerman, H.E, Van de Laar, M.A.F.J. NSAIDs: Adverse effects and their prevention. **Semin Arthritis Rheum**. V. 39, p. 294-312, 2010.

Vonkerman, H.E, Brouwers, J.R.B.J, Van de Laar, M.A.F.J. Understanding the NSAID related risk of vascular events. **Bol Med J.** V.332, p. 895-898, 2006.

Wallace, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?. **Physiol Rev**. V. 88, p. 1547-65, 2008.

Wang, Y., Yang, X., Zheng, X., Li, J., Ye, C., Song, C.Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. Fitoterapia. V. 81, p.627-31, 2010.

Winter, C.A, Risley, E.A, Nuss, G.W. Carrageenan- induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc soc exp biol med**. V. 111, p. 544-547. 1962.

Yao, C.Y., Wang, J., Dong, D., Qian, F.G., Xie, J., Pan, S.L. Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine.** V.19, p. 823-829, 2009.

Yin, W., Wang, T.S., Yin, F.Z., Cai, B.C. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica*. **J Ethnopharmacol**. V.88, p.205-214,2003.

Young, J.M, De Young L.M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. **Pharmacological methods in the control of inflammation,** Spector J, Back N (eds). Liss: New York p. 215-231, 1989.

Yuan, Y, Padol, I.T., Hunt, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nat Clin Pract Gastroenterol** Hepatol.V. 3, p. 80-89, 2006.

Anexos

Modelo de Asma Mediado por Sensibilização com Ovalbumina (OVA) e Desafio Intranasal

Foram utilizados ratos UNIB:WH cada animal recebeu uma injeção subcutânea de ovalbumina 0,15 ml de ovoalbumina (solução de 12 mg de ovalbumina, 7,8 ml de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$ em 1,2 ml de solução salina fisiológica) no dorso, no dia 0. Passados 14 dias, os animais foram previamente tratados com as substâncias testes e após uma hora do tratamento foram desafiados por via intranasal (100 µg de ovalbumina em 200 µl de soro fisiológico). Após 24 horas do desafio os animais foram sacrificados para a retirada do lavado bronco alveolar (LBAs). Após a eutanásia dos animais o LBAs foi obtido a partir da exposição da traquéia que foi canulada com um cateter jelco (24G). Através da cânula foram feitas 3 lavagens de 5 ml com PBS gelado. Os LBAs foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para as posteriores dosagens dos mediadores da inflamação asmática. O *pellet* foi resuspenso em 200 µl de PBS e utilizado para contagem total de células e para a confecção de lâmina para a contagem diferencial (Mariano et al., 2010).

Contagem Total de Celulas no LBA

Neste modelo foram feitas contagem total e contagem diferencial específica para leucócitos (neutrófilos, mononucleares e eosinófilos) encontrados no LBA, coletados 48 horas após o estímulo alérgico. Os valores são expressos como média ± d.p de leucócitos/ mL. Na contagem total, apenas a dose de 6.0 mg/kg do índigo apresentou uma inibição de leucócitos totais em 41 % . Já o controle positivo DEXA apresentou 51 % de redução de

infiltração celular, em comparação ao grupo Veículo, enquanto que o grupo SHAM, que não recebeu estímulo alérgico, apresentou como valores basais 0,6 ± 0,2 Leucócitos/ml X 10^6 (conforme a figura 1).

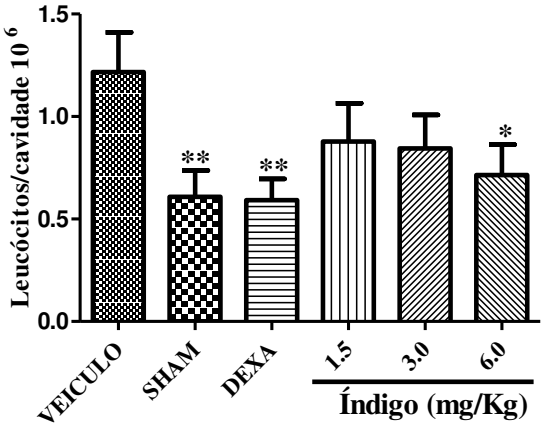


Figura 24 Inibição do infiltrado celular pelo índigo através do modelo de asma sensibilizado por OVA . Valores apresentados em média e d.p do total de células infiltradas na cavidade pleural. *p< 0.05, ** p< 0.01 e, ANOVA seguido de Tukey.

Contagem Diferencial de Eosinófilos

O tratamento com índigo (1.5; 3.0 e 6.0 mg/kg) reduziu significativamente a infiltração de eosinófilos, em 80, 60 e 90 %, respectivamente. Já o controle positivo DEXA reduziu em 99,3 % a infiltração desse polimorfonuclear. O grupo SHAM apresentou valores basais de 0,001 Eosinófilos/ ml $_X$ 10^6 no lavado bronco alveolar, enquanto o controle negativo Veículo apresentou 0,2 ± 0,10 Eosinófilos/ ml X 10^6 (dados apresentados na figura 2).

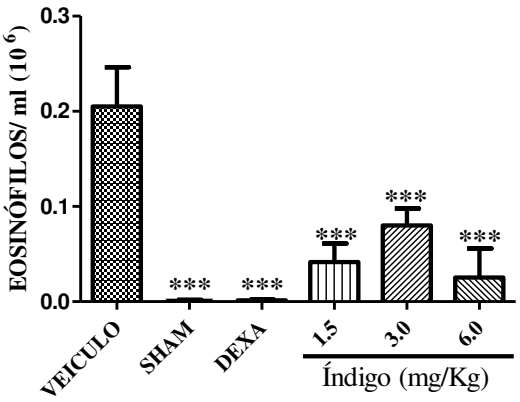


Figura 25 Redução da infiltração de eosinófilos no modelo de asma induzido por ovoalbulmina pela ação do índigo e o controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p. Teste de ANOVA seguido de Tukey.

Contagem Diferencial de Neutrófilos

A figura 3 mostra que o tratamento dos animais com índigo (1.5; 3.0 e 6.0 mg/kg) produziu redução significativa na contagem de neutrófilos em 73, 76 e 85% (0,09 ± 0,05; 0,08 ± 0,6 e 0,05 ± 0,06 Neutrófilos/ ml X 10^6), respectivamente, o controle positivo DEXA apresentou 91% (0,03 ± 0,06 Neutrófilos/ ml X 10^6) de redução de neutrófilos infiltrados, o grupo SHAM apresentou padrões basais de neutrófilos (0,04 ± 0,03 Neutrófilos/ ml X 10^6) em comparação ao Veículo (0,34 ± 0,10 Neutrófilos/ ml X 10^6).

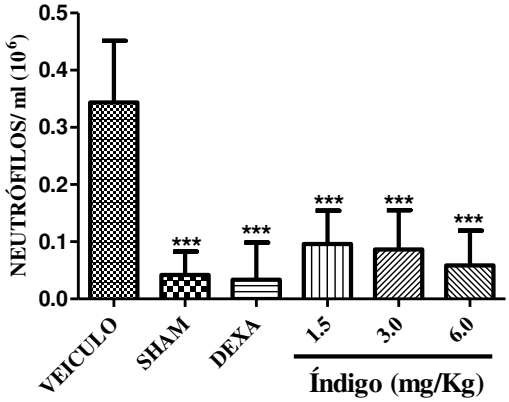


Figura 26 Redução da infiltração de neutrófilos na contagem diferencial de células no lavado bronco alveolar em modelo de asma sensibilizado por OVA pela ação do índigo e controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p de Neutrófilos/mL (10^6), *** p< 0,01 Teste de ANOVA seguido de Tukey**.**

Contagem Diferencial de Mononucleares

A figura 4 expressa a infiltração de mononucleares em lavado bronco alveolar de animais expostos a asma; para esse tipo celular, apenas o grupo controle positivo DEXA apresentou redução significativa em comparação ao grupo Veículo.

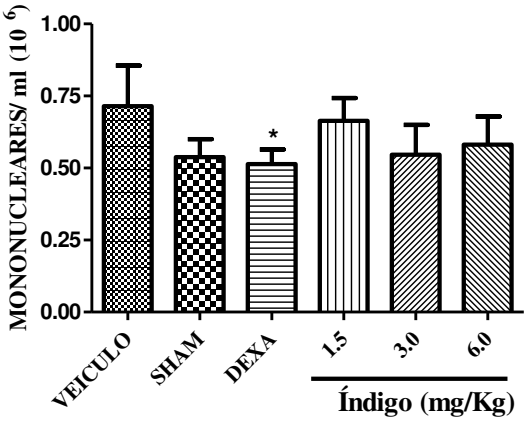


Figura 27 Redução da infiltração de mononucleares na contagem diferencial de células no modelo de asma sensibilizado por OVA pela ação do índigo e controle DEXA. Valores expressos como média ± d.p de Neutrófilos/mL. * p< 0.05, Teste de ANOVA seguido de Tukey

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1908-1**, sobre **"Estudo do alcalóide índigo na terapêutica da inflamação e da dor"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Alba Regina Monteiro de Sousa Brito / Ricardo José Dunder**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de agosto de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1908-1**, entitled **"Study of indigo alkaloids for therapeutic inflammation and pain"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 6, 2009**.

Campinas, 06 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/