

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE DIFERENTES
EXTRATOS DE *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh
(Solanaceae)

ALEXANDRA GOMES DA SILVA ALLEMAND

PORTO ALEGRE, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE DIFERENTES
EXTRATOS DE *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh
(Solanaceae)

Tese apresentada por Alexandra Gomes
da Silva Allemand para obtenção do
Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr^a. Grace Gosmann
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Roosevelt Romão

Porto Alegre, 2015.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26 de março de 2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Rosane Gomez
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a Fernanda Bueno Morrone
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Patricia Gnieslaw de Oliveira
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Allemand, Alexandra Gomes da Silva
Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de
diferentes extratos de *Capsicum baccatum* L. var.
pendulum (Willd.) Eshbaugh (Solanaceae) / Alexandra
Gomes da Silva Allemand. -- 2015.
99 f.

Orientador: Grace Gosmann.
Coorientador: Pedro Roosevelt Romão.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2015.

1. *Capsicum baccatum*. 2. inflamação. 3. nocicepção.
4. óxido nítrico. 5. TNF. I. Gosmann, Grace, orient.
II. Roosevelt Romão, Pedro, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dr^a. Grace Gosmann pela orientação, confiança, incentivo pessoal e profissional, além dos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Pedro Roosevelt Romão pelo apoio, conhecimentos e técnicas repassadas, importantes na contribuição da minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (Lab105) da Faculdade de Farmácia/UFRGS e do Laboratório de Biologia Celular e Imunologia da UFCSPA pelo companheirismo, amizade, alegria, união e por todos os momentos compartilhados.

A toda minha família por todo apoio que sempre me deram.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por proporcionar um excelente ambiente de desenvolvimento acadêmico.

RESUMO

Capsicum baccatum L. var. *pendulum* conhecida popularmente como pimenta dedo-de-moça é uma das espécies de pimenta mais consumida no Brasil. Contudo há poucos relatos na literatura científica sobre as suas propriedades farmacológicas, principalmente anti-inflamatória e antinociceptiva. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos de extratos provenientes do fruto de *C. baccatum*, utilizando modelos *in vivo* em camundongos e *in vitro* em cultura de macrófagos. Verificou-se que todos os extratos de *C. baccatum* (etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso) apresentaram atividade anti-inflamatória *in vivo*, através da redução da migração de leucócitos totais e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos inoculados com carragenina. Além disso, os extratos inibiram a resposta edematogênica induzida por carragenina, prostaglandina E₂ e histamina em patas de camundongos. A atividade da mieloperoxidase (MPO) também foi reduzida pelos extratos em tecido de patas injetadas com carragenina. Também, o efeito antinociceptivo do extrato diclorometano foi demonstrado através dos modelos de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e hiperalgisia térmica induzida pela carragenina. A inibição de alguns mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico e TNF- α também foi demonstrada pelos extratos de *C. baccatum*, *in vitro* em cultura de macrófagos peritoneais e de linhagem RAW 264.7 estimulados com carragenina, LPS e TNF- α ou LPS e IFN- γ . Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que todos os extratos de *C. baccatum* inibiram a resposta inflamatória *in vivo* através da redução da migração de neutrófilos e da formação de edema. Estes efeitos podem ser em parte, pela inibição de mediadores pró-inflamatórios como PGE₂ e histamina no sítio inflamatório, bem como pela inibição da produção de TNF- α e óxido nítrico por macrófagos. Além disso, a atividade antinociceptiva demonstrada pelo extrato diclorometano acredita-se ser mediada em nível periférico e central. Considerando-se o amplo uso desta planta no Brasil e em outros países e os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos demonstrados neste estudo, sugere-se potencial uso terapêutico de *C. baccatum*.

Palavras chave: *Capsicum baccatum*, inflamação, óxido nítrico, TNF- α .

ABSTRACT

Capsicum baccatum L. var. *pendulum*, popularly known as pepper finger-girl is one of the most consumed pepper species in Brazil, however, its pharmacological properties mainly anti-inflammatory and anti-nociceptive have not been fully characterized yet. This study aimed to investigate the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of extracts derived from the fruits of *C. baccatum*, using *in vivo* models in mice and *in vitro* in macrophages cultures. It was found that all *C. baccatum* extracts (ethanol, dichloromethane, butanolic and aqueous) showed anti-inflammatory activity by reducing of the total leukocytes and neutrophils migration into the peritoneal cavity of mice inoculated with carrageenan. Moreover, the extracts inhibited the edematogenic response induced by carrageenan, histamine and prostaglandin E₂ in mice paws. The myeloperoxidase activity (MPO) also was reduced by extracts in tissue of paws injected with carrageenan. Furthermore, the antinociceptive effect of the dichloromethane extract was demonstrated by nociception models induced by acetic acid, formalin and carrageenan-induced thermal hyperalgesia. The inhibition of some inflammatory mediators such as nitric oxide and TNF- α was also demonstrated by *C. baccatum* extracts in cultures of peritoneal macrophage and RAW 264.7 line stimulated with carrageenan, LPS and IFN- γ . In summary, the results obtained in this study demonstrated that all extracts of *C. baccatum* inhibited the inflammatory response *in vivo* by reducing neutrophil migration and edema formation. These effects may be partly due to inhibition of pro-inflammatory mediators such as histamine and PGE₂ to the inflammatory site as well as by inhibition of TNF- α and nitric oxide production by macrophages. Moreover, the antinociceptive activity demonstrated by dichloromethane extract is believed to be mediated by both peripheral and central level. Considering the widespread use of this plant in the world and the anti-inflammatory and antinociceptive effects demonstrated in this study suggests the potential therapeutic use of *C. baccatum*.

Keywords: *Capsicum baccatum*, inflammation, nitric oxide, TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sensibilização dos nociceptores primários por alguns mediadores inflamatórios liberados após lesão tecidual.....33
- Figura 2.** Frutos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*..40
- Figura 3.** Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas doses de 50, 100 e 300 mg/kg (s.c) sobre a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos estimulados com carragenina.....56
- Figura 4.** Avaliação da potência entre os extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100 mg/kg, sobre a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos estimulados com carragenina.....57
- Figura 5.** Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100mg/kg (s.c) sobre o edema de pata induzido pela carragenina, prostaglandina E₂ e histamina em camundongos.58
- Figura 6:** Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100 mg/kg, sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas de camundongos injetadas com carragenina.....59
- Figura 7:** Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) e do ácido acetil salicílico na dose de 100 mg/kg, sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.60

Figura 8. Efeito do extrato diclorometano (DCM,100 mg/kg) de <i>C. baccatum</i> e da indometacina sobre a hiperalgesia térmica induzida pela injeção de carragenina em pata de camundongos.....	61
Figura 9. Efeito do extrato diclorometano (DCM,100 mg/kg) de <i>C. baccatum</i> e da morfina sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina em pata de camundongos.....	62
Figura 10. Efeito dos extratos etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso de <i>C. baccatum</i> nas concentrações de 3, 30, 100 e 300 µg/mL sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais.	63
Figura 11. Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas concentrações de 30;100 e 300 µg/mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com carragenina.	64
Figura 12. Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais e macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS 10 ng/mL e IFN-γ 1 ng/mL.	66
Figura 13. Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na concentração de 300 µg/mL sobre a produção de TNF-α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS 10ng/m + IFNγ 1ng/mL...	67

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Revisão do tema	25
3.1 Inflamação.....	25
3.1.1 Indutores, sensores, mediadores e efetores da inflamação.	27
3.2 Dor e Nocicepção.....	28
3.3. Dor Inflamatória.....	32
3.4 Produtos naturais	37
3.4.1 Capsicum baccatum.....	39
4. Materiais e métodos	43
4.1 Material vegetal.....	43
4.2 Animais.....	43
4.3 Considerações Éticas.....	43
4.4 Células e meio de cultura.....	44
4.5 Tratamento.....	44
4.6 Ensaio in vivo	44
4.6.1 Peritonite induzida pela carragenina	44
4.6.2 Edema de pata induzido pela carragenina, prostaglandina E ₂ e histamina	45
4.6.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas injetadas com carragenina.....	46
4.6.4 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético.....	46
4.6.5 Hiperalgisia térmica induzida pela injeção intraplantar de carragenina.....	47
4.6.6 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.....	48
4.7 Ensaio in vitro	48
4.7.1 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais	48
4.7.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método de MTT	49
4.7.3 Estimulação de macrófagos peritoneais e RAW 264.7 com carragenina ou LPS + IFN- γ	49
4.7.4 Análise da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais e macrófagos RAW 264.7	50

4.75	Análise da produção de TNF- α por macrófagos peritoneais	50
5.	Análise estatística	51
6.	Resultados	55
6.1	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a migração de leucócitos e neutrófilos no modelo de peritonite induzido por carragenina em camundongos	55
6.2	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E ₂ e histamina em camundongos.....	57
6.3	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas injetadas com carragenina em camundongos	59
6.4	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos	60
6.5	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar de carragenina	61
6.6	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata de camundongos	62
6.7	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais.....	63
6.8	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com carragenina	64
6.9	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais e RAW estimulados com LPS e IFN- γ	65
6.10	Efeito dos extratos de <i>C. baccatum</i> sobre a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais com LPS e IFN- γ	67
7.	Discussão	71
8.	Conclusões	85
9.	Referências	89

Introdução

1. Introdução

A inflamação e a sensação de dor são extremamente necessárias ao organismo para protegê-lo contra danos teciduais e infecções. O processo inflamatório envolve uma complexa cascata de eventos celulares e moleculares que alteram a resposta fisiológica resultando nos sinais clássicos da inflamação como vermelhidão, calor, edema e dor no local da lesão, podendo gerar em último caso até perda da função dos tecidos envolvidos (MEDZHITOV, 2010; CHOVIATIYA E MEDZHITOV *et al.*,2014). A interação celular e molecular no tecido inflamado resulta na liberação de diversos mediadores, muitos deles capazes de sensibilizar os nociceptores primários provocando dor. A transmissão da dor envolve também complexos mecanismos celulares e moleculares que operam sozinhos ou em conjunto, no sistema nervoso periférico a partir da superfície da pele até o sistema nervoso central para produzir diferentes tipos de dor (BASBAUM *et al.*,2009).

Mesmo sendo essencial à proteção do organismo, a resposta inflamatória em muitos casos pode se tornar persistente, prejudicial e muito dolorosa, como por exemplo, uma resposta prolongada e exacerbada no combate a patógenos ou a compostos tóxicos, bem como durante doenças auto-imunes ou em condições inflamatórias crônicas. De fato, muitas evidências apotam o papel da inflamação na progressão de uma variedade de doenças tais como cardiovasculares, neurodegenerativas, obesidade, câncer entre outras (OKIN e MEDZHITOV, 2012).

Ao longo dos anos, progressos têm sido alcançados no que diz respeito à compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na inflamação e dor, como por exemplo, os mecanismos da inflamação induzida por infecção. Porém, os eventos que progridem para a inflamação crônica, como em casos de infecções crônicas e doenças autoimunes, bem como os que ocorrem em doenças cardiovasculares e Diabetes tipo 2 são pouco compreendidos (MEDZHITOV, 2008). Portanto, em todas essas condições, para muitos pacientes a resposta inflamatória e a dor continuam a produzir sofrimento, dominando e prejudicando a qualidade de suas vidas.

Além disso, o número de pessoas idosas na sociedade vem crescendo em virtude do aumento da expectativa de vida e isso acarreta uma maior prevalência de doenças relacionadas com a idade, muitas delas caracterizadas por quadros

inflamatórios e dolorosos, como por exemplo, a osteoartrite. Os avanços no controle do câncer também aumentaram a expectativa de vida dos pacientes, que muitas vezes sofrem com as dolorosas recidivas de tumores, além dos sintomas da própria quimioterapia (DUGOFF *et al.*, 2014; OMS, 2015).

A maioria dos medicamentos atualmente disponível no mercado como os anti-inflamatórios do tipo corticosteróides e não esteroides (AINEs), além dos analgésicos opióides é parcialmente efetiva e associada a efeitos colaterais e em muitos casos os opióides estão relacionados também a abuso e dependência. Portanto, a inefetividade dos tratamentos causa, além de sofrimento pessoal, custos muito elevados para a sociedade em geral (DINARELLO, 2010; PATRIGNANI e PATRONO, 2014).

Por esses motivos há uma necessidade clínica de geração de novos compostos terapêuticos seguros e eficazes para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, bem como para o alívio da dor, e as plantas medicinais têm demonstrado ser importante fonte para novas moléculas com essas propriedades farmacológicas (GAUTAM e JACHAK, 2009; COSTA *et al.*, 2012, KOEBERLE e WERZ, 2014).

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta, representada em mais de 20% do número total de espécies da Terra o que proporciona ao País um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (SIMÕES *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). Dentro desta imensa variedade de espécies encontram-se as plantas do gênero *Capsicum*, representado pelas pimentas e pimentões e as espécies mais conhecidas são *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* e *C. chinense* (Giuffrida *et al.*, 2013).

Na literatura científica há poucos relatos sobre as propriedades farmacológicas de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*, uma das espécies de pimentas mais consumidas no Brasil, conhecida popularmente como pimenta dedo-de-moça. Spiller *et al.* (2008) demonstraram atividade anti-inflamatória do suco de *C. baccatum* através do modelo de peritonite induzida por carragenina e de imunização por mBSA em camundongos pré-tratados com doses que variaram de 0,2 a 2,0 g/kg.

Recentemente nosso grupo avaliou as propriedades antioxidante e anti-inflamatória de extratos de *C. baccatum* (etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso) preparados a partir das sementes e dos frutos, através de um

fracionamento bioguiado. Os resultados mostraram que apenas os extratos etanólico e butanólico (200 mg/kg, v.o.) apresentaram significativa redução da migração de leucócitos totais para a cavidade pleural de camundongos em modelo de pleurisia induzida por carragenina, além da inibição da exsudação protéica (Zimmer *et al.*, 2012).

Diante das atividades farmacológicas apresentadas por *C. baccatum*, é importante dar continuidade às investigações das propriedades anti-inflamatórias dos extratos de *C. baccatum*, além de investigar uma possível atividade antinociceptiva, ainda não descrita na literatura para essa espécie.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de extratos preparados a partir de frutos de *Capsicum baccatum*, investigando os possíveis mecanismos de ação responsáveis pela ação farmacológica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar *in vivo*, os efeitos dos extratos de *C. baccatum* sobre:

- a migração de leucócitos e neutrófilos em modelo de peritonite induzido por carragenina, em camundongos;
- o edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E₂ e histamina, em camundongos;
- a nocicepção em modelo de contorções induzidas por ácido acético;
- a nociepção induzida por formalina em patas de camundongos;
- a hiperalgesia térmica induzida por carragenina em patas de camundongos

Avaliar *in vitro*, os efeitos dos extratos de *C. baccatum* sobre:

- a atividade da enzima MPO (mieloperoxidase) em patas de camundongos inoculadas com carragenina;
- a viabilidade celular em macrófagos peritoneais através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio);
- a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com carragenina;
- a produção de óxido nítrico e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos peritoneais e da linhagem RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon gama (IFN- γ).

Revisão do tema

3. Revisão do tema

3.1 Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma resposta imunológica a danos celulares e/ou teciduais decorrentes de infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física. A resposta inflamatória é inicialmente caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular devido à liberação de vários mediadores químicos, bem como um grande recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. Essa resposta é extremamente importante para a sobrevivência do organismo afetado, pois atua em direção à eliminação de patógenos com a finalidade da manutenção da homeostase do organismo e reestruturação do tecido lesionado. Contudo uma resposta desregulada acaba por prejudicar o próprio organismo (MEDZHITOV, 2008).

A resposta inflamatória aguda provocada por infecção ou lesão do tecido, envolve em primeiro plano a liberação dos componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) para o local da infecção ou lesão. Esta resposta tem sido melhor caracterizada quando originada pelas infecções microbianas, principalmente bacterianas, a qual é desencadeada pelos receptores de reconhecimento de padrões associados a patógenos, como os receptores Tol-like (TLRs) e NOD (“nucleotide-binding oligomerization-domain protein-“like receptors” -NLRs) presentes em células da imunidade natural (BARTON, 2008).

O reconhecimento inicial da infecção é mediado pelos macrófagos residentes e pelos mastócitos, levando a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos de cascatas proteolíticas. O principal e imediato efeito desses mediadores é a exudação de proteínas e o recrutamento de leucócitos (principalmente neutrófilos) para o tecido extravascular onde se encontra a lesão. O endotélio dos vasos sanguíneos, ativado pelos mediadores, permite o extravasamento seletivo dos neutrófilos, enquanto previne a saída dos eritrócitos. Essa seletividade é dada pela ligação de selectinas endoteliais com integrinas e receptores de quimiocinas nos leucócitos. Essa ligação ocorre tanto na superfície endotelial como no espaço extravascular através de proteínas plasmáticas que formam uma matriz provisória para a ligação das integrinas dos leucócitos (POBER e SESSA 2007).

Quando os neutrófilos chegam ao local da lesão eles se tornam ativados, tanto pelo contato direto com os patógenos como pela ação das citocinas secretadas pelas células residentes. Os neutrófilos ativados liberam conteúdo tóxico, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase na tentativa de matar os agentes invasores, no entanto, esse conteúdo tóxico não diferencia os agentes microbianos do tecido do hospedeiro sendo, portanto, inevitável o dano colateral ao tecido. O sucesso da resposta inflamatória aguda resulta na eliminação dos agentes invasores seguida pela fase de resolução e reparação tecidual, a qual é mediada principalmente pelos macrófagos residentes e recrutados. O processo de transição da inflamação para a resolução é crucial e dado pelos mediadores lipídicos pró-inflamatórios (prostaglandinas) e anti-inflamatórios (lipoxinas). As lipoxinas inibem o recrutamento dos neutrófilos e em contrapartida promovem o recrutamento de monócitos responsáveis pela remoção das células mortas e início da remodelação tecidual. Outros fatores responsáveis pela resolução da inflamação e reparação tecidual são as resolvinas e protectinas, também mediadores lipídicos, bem como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fatores de crescimento (SERHAN, 2007).

Contudo, se houver falha na eliminação do patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O recrutamento de neutrófilos é seguido pelo acúmulo de macrófagos e linfócitos T. No entanto, se a combinação desses fatores também não for suficiente, inicia-se um estado inflamatório crônico, envolvendo a formação de granulomas (acúmulo de macrófagos ao redor do patógeno ou corpo estranho, após a tentativa frustrada de destruição). As características deste estado inflamatório podem ser diferentes dependendo do fenótipo de células da classe T presentes. Além da presença contínua do patógeno, a inflamação crônica pode resultar também de outras causas como as respostas auto-imunes, que levam ao dano tecidual (DRAYTON *et al.*, 2006; CHOVIATIYA e MEDZHITOV, 2014).

Nota-se que os mecanismos da inflamação induzida por infecção são melhores compreendidos do que os mecanismos da resposta inflamatória crônica sistêmica. Porém pode-se classificar genericamente a via inflamatória em mecanismos indutores, sensores, mediadores e efetores (MEDZHITOV, 2010; MURAKAMI e HIRANO, 2012).

3.1.1 Indutores, sensores, mediadores e efetores da inflamação.

Os indutores são os sinais que iniciam a resposta inflamatória. Eles ativam sensores especializados que promovem a produção de um conjunto de mediadores. Estes, por sua vez, alteram o estado funcional de órgãos e tecidos (os quais são os efetores da inflamação) de um modo que lhes permite adaptar-se às condições indicadas pelos indutores da inflamação. Os indutores da inflamação podem ser exógenos ou endógenos. Os indutores exógenos podem ser classificados em dois grupos: os de origem microbiana (“pathogen-associated molecular patterns” – PAMPs - e fatores de virulência) e origem não microbiana (alérgenos, irritantes, corpos estranhos e compostos tóxicos). Indutores endógenos são sinais produzidos por tecidos danificados, em condições fisiológicas anormais ou em condições de estresse. As características destes sinais não são bem descritos na literatura, talvez porque os indutores endógenos exerçam sua atividade apropriada *in vivo* somente em determinadas combinações e/ou somente no contexto de tecidos lesados ou em condições de mau funcionamento. Por exemplo, isquemia local, hipóxia, aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio, etc, são todos associados com dano tecidual ou mau funcionamento, mas não são reproduzidos em condições *in vitro* de cultura de tecidos, as quais são comumente caracterizadas por concentrações suprafisiológicas de oxigênio e nutrientes (MEDZHITOV 2008, 2010).

Os indutores da inflamação acarretam a produção de numerosos mediadores inflamatórios, que por sua vez, alteram a fisiologia de muitos tecidos e órgãos. Esses mediadores podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou secretados por células, principalmente macrófagos residentes e mastócitos ou células presentes no tecido. Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas em aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas e enzimas proteolíticas (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; SHAIKH, 2011). Muitos desses mediadores que são capazes também de provocar dor serão descritos mais detalhadamente no item 3.31.

3.2 Dor e Nocicepção

Assim como o processo inflamatório, a capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e o bem-estar do organismo. A sensação de dor nos alerta para uma lesão real ou iminente e desencadeia respostas de proteção adequadas (BASBAUM *et al.*, 2009). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano” (The International Association for the Study of Pain).

A dor pode ser classificada de acordo com algumas variáveis, como o tempo de duração (aguda e crônica), de acordo com os mecanismos patofisiológicos (dor fisiológica, nociceptiva e neuropática) e ainda de acordo com seu contexto clínico (pós-cirúrgica, relacionada a tumores, neuropática e degenerativa). A dor aguda é relacionada a dano tecidual, geralmente com duração limitada e associada à redução da intensidade com o tempo, enquanto que a dor crônica pode ser definida como um desconforto persistente por um período de 3 a 6 meses, além daquele necessário para a cura da lesão (VADIVELU *et al.*, 2009).

A dor fisiológica é definida como um desconforto não traumático de curta duração, cujo objetivo é alertar o indivíduo sobre a presença de um estímulo potencialmente prejudicial, como um objeto quente, evitando ou minimizando a lesão tecidual através de movimentos reflexos. A dor nociceptiva tem sido denominada de dor inflamatória, pois a inflamação periférica bem como os mediadores inflamatórios representam importantes papéis no seu início e desenvolvimento. É definida como percepção a um estímulo nocivo resultante de dano celular relacionado a condições traumáticas, cirúrgicas ou relacionado a doenças. Em geral, a intensidade da dor inflamatória é proporcional à magnitude do dano tecidual e liberação de mediadores inflamatórios. Por fim, a dor neuropática é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “dor iniciada ou causada por uma disfunção ou lesão patológica” nos nervos periféricos e sistema nervoso central (SNC) e caracteriza-se por ocorrer em situações em que não há identificação de estímulo nocivo ou na ausência de inflamação detectável. Doenças associadas com a dor neuropática incluem infecções (herpes zoster), distúrbios metabólicos

(diabetes neuropática), toxicidade (quimioterapia) entre outros (COSTIGAN *et al.*, 2009).

Quando se refere à dor, alguns distúrbios podem estar relacionados, como a **Hiperalgesia e Alodinia**. Hiperalgesia se caracteriza pela sensibilização de nociceptores polimodais e é responsável por provocar uma resposta exarcebada a um estímulo normalmente nocivo. Pode ser classificada em primária (sensibilidade à dor no local da lesão, relacionada à liberação periférica de mediadores) e secundária (sensibilidade em locais adjacentes ao lesionado e relacionada com alterações na excitabilidade dos neurônios espinhais e supra-espinhais). **Alodinia** é definida pela sensibilização de mecanorreceptores que promovem uma resposta dolorosa a estímulos não nocivos, como por exemplo, o contato com um algodão (COUTAUX *et al.*, 2005; STEEDS, 2009).

Como descrito anteriormente, a dor é definida como uma experiência, resultado de uma complexa interação entre sistemas de sinalização, modulação dos centros mais elevados e a percepção única do indivíduo. A ativação nociceptiva nem sempre produz dor e, inversamente, a dor pode ocorrer na ausência de um estímulo nociceptivo identificável (NAVRATILOVA e PORRECA, 2014).

Em 1906 Sherrington introduziu o conceito de nocicepção a fim de diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação da dor, propriamente dita. A nocicepção envolve a **detecção** de um estímulo nocivo pelos nociceptores; a **transdução**, que corresponde à conversão desses estímulos em sinais neuronais a partir de alterações de potenciais elétricos na membrana e consequente geração de potencia de ação; envolve a **transmissão** desses sinais por fibras aferentes primárias para o cérebro, onde por fim ocorre a **modulação**, que compreende à inibição ou facilitação das informações nociceptivas da periferia ao SNC, através de fibras eferentes que descendem do cérebro para a medula espinhal (COUTAUX *et al.*, 2005; VADIVELU *et al.*, 2009).

As estruturas responsáveis por detectar os estímulos dolorosos são chamadas de **nociceptores**, terminações nervosas livres que representam a parte mais distal de um neurônio aferente. São amplamente encontrados na pele, músculos, mucosas, tendões, tecido conectivo de órgãos viscerais entre outros e podem ser ativados por estímulos de alta intensidade com potencial dano tecidual,

como estímulos mecânicos, eletromagnéticos, elétricos, térmicos e químicos (STEEDS *et al.*, 2009; GUYTON e HALL, 2011).

Ao receberem os estímulos dolorosos, os nociceptores disparam potenciais de ação em neurônios aferentes primários e o impulso nervoso gerado se propaga pelas fibras nervosas aferentes (ascendentes) até a medula espinhal e desta para o córtex cerebral, onde serão comandadas e geradas as respostas fisiológicas e comportamentais. As fibras nervosas que conduzem o impulso nervoso podem ser do tipo A δ (fibras de condução rápida, relacionadas à dor aguda) e do tipo C (fibras de condução “lenta”, relacionadas à dor crônica) representadas por cerca de 60-90% dos neurônios aferentes primários de origem cutânea ou de tecidos mais profundos (BASBAUM *et al.*, 2009; VADIVELU *et al.*, 2009; SCHAIBLE, 2007).

Ao entrarem na medula espinhal as fibras periféricas fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lamina II (substância gelatinosa) da medula espinhal e propagam a mensagem nociceptiva até o encéfalo através de uma variedade de neurotransmissores (como o aminoácido excitatório, glutamato ou o peptídeo substância P). As fibras terminais se projetam principalmente ao tálamo e posteriormente ao córtex somatossensor, onde ocorre a somatização da dor, ou emitem axônios ao componente emocional da dor (SCHAIBLE, 2007; GUYTON e HALL, 2011).

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da sensação dolorosa, o organismo humano dispõe de sistemas **moduladores** da dor, também denominado de sistema de supressão da dor (“analgesia”) que ocorre tanto no encéfalo como na medula espinhal. Este sistema consiste em três grandes componentes: PAG (**área da substância cinzenta periaquedutal**), NMF (**núcleo magno da rafe**) e complexo inibitório da dor (NAVRATILOVA e PORRECA, 2014). **No complexo inibitório da dor**, localizado nos cornos dorsais da medula espinhal, ocorre a depressão dos neurônios nociceptivos e neste ponto, os sinais de analgesia podem ser bloqueados a partir de transmissões descendentes vindas de PAG e NMF, bem como antes mesmo da dor ser transmitida para o encéfalo. Os principais neurotransmissores envolvidos no sistema de analgesia são a encefalina e serotonina, secretadas pela PAG e NMR (OSSIPOV *et al.*, 2010).

Como descrito anteriormente, a maioria dos nociceptores, são fibras do tipo C e considerados polimodais, isto é, respondem a **estímulos químicos** como a

bradicinina, à estímulos químicos irritantes, como ácidos ou capsaicina (a substância responsável pela pungência da pimenta), **estímulos térmicos** e **mecânicos persistentes**. Portanto, para que ocorra a transdução neuroquímica dos diversos estímulos nocivos e geração do potencial de ação, os nociceptores expressam na sua membrana canais iônicos (canais de sódio dependente de voltagem e canais iônicos operados por receptor), receptores acoplados a proteínas G (que ativada libera segundos mensageiros que influenciam os canais iônicos) e ainda receptores associados à tirosina quinase (BASBAUM *et al.*, 2009; SCHAIBLE, 2007). Dentre os canais iônicos operados por ligantes, os mais importantes e estudados compõem a família dos receptores de potencial transitório (TRP) e os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs). Da família dos TRP, o mais descrito é o TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1), comumente referido como receptor da capsaicina, foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos; compostos vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo (≥ 43 °C) e pH baixo ($< 5,9$). Desde então, tem sido reportado que o TRPV1 é ativado pela cânfora, alicina, óxido nítrico (NO), toxinas de aranha e mediadores lipídicos como endovanilóides (anandamida) e produtos da lipoxigenase (leucotrieno B4); potencializado pelo etanol, nicotina e citocinas próinflamatórias e modulado por cátions extracelulares (JULIUS, 2013).

Os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) são canais de cátions insensíveis à voltagem e são ativados por prótons extracelulares e modulados pela proteína quinase C (PKC). Alguns estudos demonstraram que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como o fator de crescimento do nervo (NGF), serotonina, interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (BASBAUM *et al.*, 2009).

3.3. Dor Inflamatória

A nociceção gerada em resposta a danos teciduais bem como ao processo inflamatório compreende o envolvimento de 3 diferentes grupos de indução. O primeiro grupo é composto por fatores liberados pelo próprio dano celular e tecidual, como os íons hidrogênio (H⁺) e adenosina trifosfato (ATP), responsáveis pela ativação direta dos nociceptores levando a uma prévia excitabilidade neuronal. Íons hidrogênio interagem com receptores ASIC-1 e sensibilizam receptores TRPV1, enquanto que ATP se liga em receptores (P₂X₃) resultando na abertura de canais de cátion (não só – fenda) desencadeando a despolarização na terminação nervosa. O segundo grupo está relacionado ao processo inflamatório em si e inclui os diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária (PAF), leucotrienos, citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas entre outros. Muitos desses mediadores estão entre os estímulos químicos capazes de sensibilizar os nociceptores, desencadeando a dor inflamatória. Essas substâncias se ligam a receptores acoplados a proteína G e induzem fosforilação de proteínas quinases (PKA e PKC). Estas aumentam a eficiência de canais de sódios (TTX - tetrodotoxin-resistentes), diminuindo o limiar de despolarização dos nociceptores e tornando-os responsivos a estímulos de baixa intensidade o que caracteriza o surgimento da hiperalgesia. O terceiro grupo compreende substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CRGP) que são liberadas pelos nociceptores, podendo ativá-los direta ou indiretamente (COUTAUX *et al.*, 2005; ANDERSSON e TRACEY, 2012; REICHLING *et al.*, 2013). A figura 1 mostra um resumo dos mediadores liberados após uma lesão tecidual e a sensibilização pelos nociceptores primários.

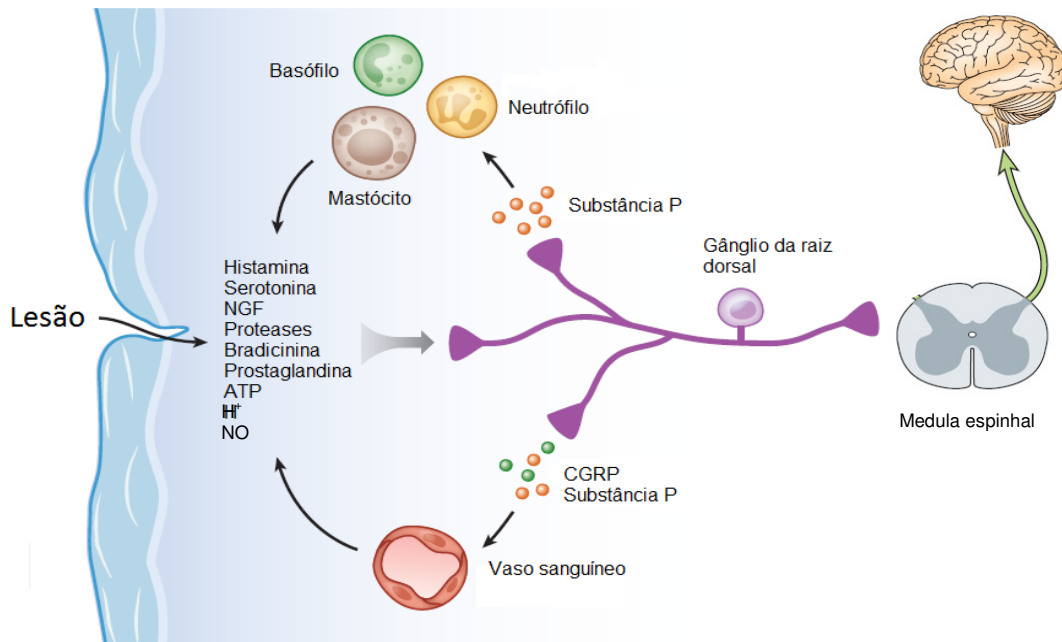


Figura 1. Sensibilização dos nociceptores primários por alguns mediadores inflamatórios liberados após lesão tecidual.

Os impulsos nervosos são conduzidos pelas fibras aferentes até os seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e após até a medula espinhal e encéfalo. H⁺: prótons, NO: óxido nítrico, CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

Figura adaptada de Julius, 2013.

3.31 Mediadores inflamatórios e nociceptivos

Aminas vasoativas (histamina e serotonina): são formadas e armazenadas em grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas e são produzidas de modo “tudo ou nada” através da degranulação de mastócitos e plaquetas. Elas exercem um complexo efeito sobre o tecido vascular, causando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do contexto. As consequências imediatas da sua liberação por mastócitos podem ser altamente prejudiciais em indivíduos sensíveis, resultando em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático. Além disso, as aminas vasoativas também estão entre os mediadores responsáveis pela sensação de dor na inflamação, através de sua ação sobre os neurônios sensoriais (MEDZHITOV, 2008).

Mediadores lipídicos: incluem os eicosanóides e fatores de ativação de plaquetas (PAF). Após a ativação intracelular pelos íons Ca²⁺, a enzima fosfolipase A₂ a partir dos fosfolipídeos da membrana celular, produz ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, precursores de duas classes de mediadores lipídicos. Os **fatores de**

ativação plaquetária (PAF) são gerados pela acetilação do ácido lisofosfatídico e ativam vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo recrutamento de leucócitos, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação plaquetária (MEDZHITOV, 2008). A classe dos eicosanóides é formada a partir do ácido araquidônico, que ao ser metabolizado pelas cicloxigenases (COX-1 e COX-2) formam os mediadores lipídicos como as **prostaglandinas e tromboxanos**, ou quando metabolizado pelas lipoxigenases formam os **leucotrienos e lipoxinas**. As lipoxinas inibem e promovem a resolução da inflamação e reparação tecidual. As prostaglandinas PGE₂ e PGI₂, por sua vez, causam vasodilatação e a PGE₂ também é hiperalgésica e potente indutora de febre. As **prostaglandinas** agem em receptores de prostanóides (EP, DP e IP) nos nociceptores. A ativação da adenilato ciclase promove o aumento na concentração de AMPc que sensibiliza os terminais nociceptivos em parte pelo aumento da permeabilidade de sódio, com consequente diminuição do limiar da dor (SCHAIBLE, 2007; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Citocinas inflamatórias: as citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos, liberados principalmente por células inflamatórias. Podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) e fator de transformação de crescimento (TGF- β). Algumas são anti-inflamatórias enquanto que outras são pró-inflamatórias. O efeito biológico depende da citocina e do tipo da célula envolvida, sendo que, de um modo geral, as citocinas apresentam influência na ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular e as citocinas pró-inflamatórias participam de reações inflamatórias agudas, crônicas e reparo tecidual. Além disso, elas iniciam e controlam o processo de cicatrização, com estimulação da reepitalização, angiogênese e deposição de colágeno (DINARELLO, 2007). O TNF- α é uma citocina chave do processo inflamatório, pode ser produzido por células do endotélio, mas principalmente por células inflamatórias como os macrófagos ou neutrófilos, linfócitos T e mastócitos em resposta a muitos estímulos extracelulares como outras citocinas, proteína de choque térmico, isquemia, luz UV e infecções microbianas. O TNF- α exerce potentes efeitos inflamatórios como o aumento da permeabilidade vascular, indução da expressão de moléculas de adesão celular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1), além de ser um potente ativador de neutrófilos e

fagócitos mononucleares. O TNF- α , induz a liberação de outras citocinas como as interleucinas IL-1 β e IL-8, e aumenta a expressão da COX-2 com consequente liberação das prostaglandinas, principalmete PGE₂ potente indutora da hiperalgesia (BRADLEY *et al.*, 2008; SEDGER e MCDERMOTT, 2014). Além disso, esta citocina também pode agir em receptores para TNF- α nos nociceptores produzindo a sensibilização, embora seus mecanismos moleculares ainda não estejam claros (CZESCHKA *et al.*, 2008; HESS *et al.*, 2011).

Peptídeos vasoativos: a **substância P** é um neurotransmissor armazenado na forma inativa em vesículas secretoras e liberado por nociceptores e juntamente com outro neurotransmissor o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (GRP) induz vasodilatação e extravasamento vascular de fuidos e proteínas, além de ativar neutrófilos e causar a degranulação de mastócitos (MEDZHITOV, 2008). Outro peptídeo importante é a **bradicinina**, que além do efeito sobre o tecido vascular possui um potente efeito pró-algesia (estimulação da dor). A bradicinina ativa as cascatas de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-8) e do ácido araquidônico com consequente produção de prostaglandinas. Além disso, a bradicinina estimula a liberação de peptídeos como neurocininas e CGRP em terminações nervosas aferentes e induz a produção de óxido nítrico. Outro efeito relacionado à bradicina é a degranulação de mastócitos que leva a liberação de histamina e serotonina. Portanto, em conjunto, os peptídeos, o óxido nítrico, a histamina e a serotonina são os principais responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular atribuída indiretamente a bradicinina. Finalmente, a bradicinina quando se liga a receptores B₂ ativa canais de cátions como o TRPV1 o que pode explicar o calor induzido por bradicinina (COUTAUX, 2005; Mizumura *et al.*, 2009).

Óxido nítrico: é uma importante molécula de sinalização intercelular e intracelular envolvida em diversos mecanismos fisiológicos e patofisiológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico. Em concentrações fisiológicas o óxido nítrico (NO) atua no sistema imune como uma molécula efetora citostática e citotóxica, a qual inibe o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos. Além disso, apresenta atividade antitumoral (através da morte e/ou inibição do crescimento da célula tumoral); antitrombótica e anti-aterosclerótica, pois relaxa a musculatura lisa

vascular, modula a proliferação de células musculares lisas, inibe a agregação plaquetária e adesão e migração de leucócitos (TOUSOULIS *et al.*, 2012; ANTOSOVA *et al.*, 2012).

Tem sido demonstrado que NO pode ser pró-inflamatório (imunoestimulador, anti-apoptótico) ou anti-inflamatório (imunossupressor e pró-apoptótico), com propriedades protetoras ou agressoras ao hospedeiro durante infecções e por isso, o óxido nítrico não pode ser classificado rigidamente como uma molécula anti-inflamatória ou pró-inflamatória (CIRINO *et al.*, 2006).

Por outro lado, sabe-se que o NO pode agir como citotóxico em processos patofisiológicos e muitos trabalhos apontam o envolvimento do NO em diversas desordens inflamatórias. Durante o processo inflamatório, grandes quantidades de NO são produzidas principalmente por neutrófilos e macrófagos ativados, através da enzima iNOS, podendo ser prejudicial para o organismo, visto que o NO age como uma espécie reativa danificando a membrana celular de células normais. Evidências indicam que a citotoxicidade do NO é atribuída principalmente ao peroxinitrito (ONOO), produzido a partir da reação entre o NO e o radical livre ânion superóxido (O_2^-). *In vivo*, o peroxinitrito causa danos ao DNA e oxidação a lipoproteína de baixa densidade (LDL), efeitos que estão frequentemente associados a condições patofisiológicas como asma, artrite, esclerose múltipla, colite, psoríase, doenças neurodegenerativas, desenvolvimento de tumores, rejeição a transplantes e ao choque séptico (PACHER *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007).

O óxido nítrico também é considerado um importante mediador de hiperalgesia no SNC, porém seus efeitos na periferia ainda não estão bem elucidados. Dados da literatura descrevem que doadores de NO podem induzir dor em humanos e a administração de inibidores de NO reduz a hiperalgesia inflamatória via PGE_2 dependente (CURY *et al.*, 2011).

A síntese de NO ocorre a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima conhecida como óxido nítrico sintase (NOS) dependente de oxigênio molecular. A enzima NOS constitui uma família com três isoenzimas codificadas por genes distintos e denominadas como: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), sendo a última, a forma presente em macrófagos e outras células inflamatórias ativadas. As isoformas nNOS e eNOS são conhecidas como constitutivas, porque,

diferentemente da iNOS estas proteínas são expressas constitutivamente em baixos níveis e podem ser ativadas rapidamente por um aumento de cálcio no citoplasma, na presença de calmodulina. O influxo de cálcio dentro das células leva a uma rápida produção de NO em pequenas quantidades e por curto período de tempo. A iNOS possui uma molécula de calmodulina fortemente ligada, mantendo-a numa conformação ativa, mesmo em baixos níveis de cálcio, podendo ser denominada NOS - cálcio independente. Esta enzima pode produzir, constantemente, altas concentrações de NO por períodos prolongados (PACHER *et al.*, 2007, PAUTZ *et al.*, 2010).

A enzima iNOS é induzida por macrófagos ativados por citocinas como interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou lipopolissacarídeo (LPS) e resulta em maiores quantidades de NO comparado com a NOS constitutiva e este aumento pode levar a diferentes efeitos patofisiológicos, conforme descrito anteriormente. Por esses motivos, muitas pesquisas tem focado no controle da superprodução dos níveis de NO através da inibição da iNOS, com o intuito de desenvolver novos medicamentos para o tratamento de doenças mediadas pelo NO (SHARMA *et al.*, 2007; VÍTEČEK *et al.*, 2012).

3.4 Produtos naturais

As plantas medicinais são frequentemente utilizadas com o intuito de auxiliar as terapias convencionais ou até mesmo substituir o tratamento de várias doenças, dentre outros fatores pela facilidade de obtenção e baixo custo. Além disso, mesmo que os medicamentos derivados de plantas tenham uma boa aceitação pela população e estejam presentes no mercado farmacêutico, apenas uma pequena parcela das plantas medicinais possui dados científicos que comprovem sua eficácia e seu espectro toxicológico, assim como garantia de qualidade do produto (SIMÕES *et al.*, 2007). Sabe-se que as plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, tanto que ao longo dos anos, os produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de medicamentos importantes utilizados na medicina moderna. No entanto, o potencial de plantas como fonte de

novos compostos com propriedades terapêuticas ainda é pouco explorado (KOEBERLE e WERZ, 2014; HARVEY *et al.*, 2015).

Em conjunto, todos esses fatos justificam a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos.

Dentre os diversos metabólitos secundários presentes nas plantas, alguns grupos que deram origem a medicamentos são os terpenóides, glicosídeos e alcalóides. Muitos exemplos históricos demonstram que os produtos naturais serviram não apenas como fonte de medicamentos, mas também ajudaram a revelar novos aspectos da fisiologia. Por exemplo, o fármaco digoxina (glicosídeo) obtido da planta dedaleira (*Digitalis sp.*), é utilizado até hoje como cardiotônico para o tratamento da insuficiência cardíaca e além disso mostrou o papel da sódio-potássio-ATPase. A morfina (alcalóide), extraída da papoula (*Papaver somniferum*) é um analgésico opióide largamente utilizado na clínica e apontou o caminho para os receptores dos opióides endógenos; enquanto que a muscarina, nicotina e tubocurarina ajudaram a explorar os diferentes tipos de receptores de acetilcolina, e assim por diante (HARVEY, 2008). Atualmente, diante da necessidade clínica por novos medicamentos mais eficazes e seguros para o tratamento de doenças inflamatórias, bem como para o alívio da dor, extratos e compostos isolados de plantas estão sendo considerados como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos, em busca de uma melhor terapia e qualidade de vida dos pacientes (KOEBERLE e WERZ, 2014; HARVEY *et al.*, 2015). Dentro deste contexto, muitos trabalhos têm demonstrado propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de compostos derivados de plantas, incluindo efeitos sobre a expressão de moléculas pró-inflamatórias como a enzima óxido nítrico sintase (iNOS), a cicloxigenase 2 (COX-2) e citocinas como TNF- α , entre outros (HUR *et al.*, 2012; BELLIK *et al.*, 2013; RIEDEL *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Esses dados, reforçam a importância de buscar através das plantas, novos compostos biologicamente ativos ou passíveis de modificações e otimizações estruturais para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros no tratamento de doenças inflamatórias e alívio da dor.

3.41 *Capsicum baccatum*

O gênero *Capsicum* pertence à família das Solanáceas e compreende 25 espécies sendo representado pelas pimentas e pimentões e as espécies mais conhecidas são *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubscens* e *C. chinense*. Os frutos do gênero *Capsicum* contêm uma vasta quantidade de compostos, como os carotenóides, responsáveis pela coloração vermelha do fruto, vitaminas A, C e E, ácidos graxos saturados ou insaturados, óleos voláteis e capsaicinóides (WAHYUNI *et al.*, 2011, 2013, GIUFFRIDA *et al.*, 2013).

O principal grupo de componentes ativos no gênero *Capsicum* são os capsaicinóides, responsáveis pela sensação de ardor e pungência e a capsaicina representa cerca de 90% do total de componentes deste grupo (SINGH *et al.*, 2009; AZA-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Dentre os capsaicinóides, o mais estudado é a capsaicina, com vários trabalhos na literatura sobre suas atividades farmacológicas, entre as quais: analgésica (KNOTKOVA *et al.*, 2008), anticâncer (YANG *et al.*, 2010), anti-inflamatória, antioxidante e anti-obesidade (JOO *et al.*, 2010; ANAND E BLEY, 2011, SHARMA *et al.*, 2013).

Em relação aos frutos da espécie *C. baccatum*, a sua pungência (ardor, picância), típico dos capsaicinóides presentes nas pimentas, é baixa, eles medem entre 6,8 e 8,0 cm e têm de 1,0 a 1,5 cm de largura, apresentam várias cores e formas, geralmente pendentes, persistentes, com polpa firme com sementes cor de palha. São exemplos de frutos de *Capsicum baccatum*: Cambuci ou Chapéu-de-Frade, Dedo-de-Moça, Cumari verdadeira, pimenta fina e pitanga. São nativos da América do Sul, cultivados principalmente na Argentina, Colômbia, Equador e Brasil, nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (EMBRAPA E HOTALIÇAS 2007; ALBRECHT *et al.*, 2012).

Capsicum baccatum L. var. *pendulum* (Willd.) (figura 2) é uma das espécies de pimenta mais consumidas no Brasil e apesar disso, há poucos relatos na literatura científica sobre suas propriedades farmacológicas. Estudos mais recentes realizados com outras espécies de *Capsicum* reportam importantes propriedades como hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva para espécies de *C. annuum* (AIZAWA E INAKUMA, 2009; HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014), *C. chinense* (CASTRO-CONCHA, 2014) e *C. frutescens*

(JOLAYEMI, 2013, 2014). Os trabalhos descritos com *C. baccatum* var. pendulum destacam as propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos brutos preparado a partir dos frutos (KAPPEL *et al.*, 2008) e propriedades anti-inflamatórias do suco (SPILLER *et al.*, 2008).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou as propriedades antioxidante e anti-inflamatória de extratos de *C. baccatum* (etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso) preparados a partir das sementes e dos frutos, através de um fracionamento bioguiado (ZIMMER *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que no modelo de inflamação pleural induzida por carragenina, os extratos etanólico e butanólico (dose de 200 mg/kg, via oral) causaram significativa redução da migração de leucócitos totais para a cavidade pleural de camundongos, além da inibição da exsudação protéica (ZIMMER *et al.*, 2012). Por esses motivos é importante a investigação das propriedades farmacológicas de *C. baccatum*, os mecanismos de ação envolvidos, bem como a composição química desta espécie.



Figura 2. Frutos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*. Fonte: Embrapa Hortalças. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#pimenta>.

Materials e métodos

4. Materiais e métodos

4.1 Material vegetal

Para a obtenção dos extratos de frutos de *C. baccatum* foi utilizado o material previamente coletado conforme Zimmer *et al.* (2012). O material vegetal moído foi submetido à maceração com etanol 70% para obtenção do extrato etanólico. Além disso, extrações sucessivas em aparelho tipo *soxhlet* com solventes de polaridade crescente (diclorometano, n-butanol e água) forneceram os respectivos extratos, que foram posteriormente levados à secura por evaporação do solvente. Os extratos foram congelados em pequenas frações até o momento do uso.

4.2 Animais

Para este trabalho foram utilizados camundongos machos BALB/c (n= 6), com idade de 8 semanas obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) por pelo menos 1 semana antes da condução dos ensaios biológicos, realizados nos Laboratórios de Imunologia e Biologia celular da UFCSPA. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas (6 animais/caixa), à temperatura ambiente padrão ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), expostos a ciclos alternados de claro/escuro por 12 h e com água e ração *ad libitum*.

4.3 Considerações Éticas

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Legislação Brasileira e após aprovação pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFCSPA sob protocolo nº 205/13. As carcaças dos animais sacrificados foram acondicionadas em embalagem plástica e armazenadas em freezer a -20°C , até o recolhimento pela empresa especializada Ambientus Tecnologia ambiental Ltda.

4.4 Células e meio de cultura

Foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c obtidos da cavidade peritoneal de animais inoculados com tioglicolato, conforme descrito no item 4.71. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ com controle de umidade.

4.5 Tratamento

Para os experimentos *in vivo*, os extratos foram pré-dissolvidos em PBS contendo Tween 80 (máximo 0,5%) e administrados aos animais por via subcutânea nas doses de 50, 100 e 300 mg/kg. As doses foram escolhidas a partir de dados da literatura e resultados prévios do nosso grupo (ZIMMER *et al.*, 2012). Para os experimentos *in vitro*, os extratos foram dissolvidos no próprio meio de cultura e as células tratadas com concentrações entre 30 e 300 µg/mL.

4.6 Ensaio *in vivo*

4.6.1 Peritonite induzida pela carragenina

Para avaliar o efeito dos extratos sobre a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, foi utilizado o modelo de peritonite induzido por carragenina. Grupos de camundongos BALB/c (n= 6) foram pré-tratados por via subcutânea com PBS (grupo controle negativo 0,1mL/10g) ou extratos de *C. baccatum*, 30 minutos antes da injeção intraperitoneal do estímulo inflamatório carragenina (500 µg/cavidade/0,2 mL). Dexametasona (2 mg/kg; v.o.) foi usada como controle positivo e administrada 1 h antes da carragenina. Primeiramente foi avaliado o efeito dos 4 extratos (diclorometano, etanólico, butanólico e aquoso) nas doses de 50, 100 e 300 mg/kg com o intuito de analisar o efeito da dose na migração celular. Posteriormente realizou-se um experimento com todos os extratos em uma única dose (100 mg/kg) para avaliar a diferença de potência entre eles. Após 4 h da inoculação da carragenina, os camundongos foram

eutanasiados e 3 mL de PBS contendo EDTA 1 mM foram injetados intraperitonealmente nos camundongos. Logo após, os abdomens foram cuidadosamente massageados e a suspensão celular aspirada. Alíquotas dessa suspensão foram utilizadas para a contagem de leucócitos totais em solução de Turk através da câmara de Neubauer e para contagem diferencial por meio de lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com Panótico. A contagem celular foi feita em microscópio óptico e os resultados apresentados como número de leucócitos e neutrófilos por cavidade.

4.6.2 Edema de pata induzido pela carragenina, prostaglandina E₂ e histamina

Grupos de camundongos BALB/c (n= 6) foram pré-tratados por via subcutânea com PBS (grupo controle negativo 0,1mL/10g) ou extratos de *C. baccatum* na dose de 100 mg/kg, 30 minutos antes da indução do edema. Dexametasona (2 mg/kg; v.o.) foi usada como controle positivo e administrada 1 h antes da indução do edema. Após os tratamentos, os animais receberam na pata traseira por via intraplantar uma injeção de 50 µL dos estímulos inflamatórios: carragenina (500 µg/pata), histamina (100 µg/pata) ou prostaglandina E₂ (5 µg/pata). A pata esquerda de cada animal recebeu 50 µL of PBS como controle negativo. O edema de pata foi determinado através do volume de água deslocado utilizando um pletismômetro e medido nos tempos de 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da carragenina e nos tempos de 15, 30, 60 e 90 min após as injeções de prostaglandina E₂ ou histamina. Os resultados foram expressos em microlitros (µL) e corresponde à diferença de volume entre a pata direita e esquerda de cada animal. Logo após as medidas, os animais que receberam carragenina na pata foram eutanasiados e o tecido da pata foi removido e armazenado em freezer a - 80°C para posterior análise da atividade da mieloperoxidase.

4.6.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas injetadas com carragenina

Para avaliar o efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a migração de neutrófilos para o tecido da pata inoculada com o agente inflamatório carragenina, os níveis de atividade da enzima MPO na pata foram mensurados. A metodologia foi previamente descrita por Bradley *et al.* (1982) e modificada por De Young *et al.* (1989). Amostras de tecido das patas injetadas com carragenina foram homogeneizadas com 5% de tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a 4°C. O precipitado formado foi ressuspensionado em 0,5% de tampão BHT (brometo de hexadeciltrimetil amônio) pH 5,4 e as amostras foram então submetidas a três ciclos de congelamento (imersão em nitrogênio líquido) e descongelamento. Após o último descongelamento as amostras foram novamente centrifugadas (15000 rpm, 15 min, 4°C) e 5 µL do sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO em placas de 96 poços. A reação enzimática foi iniciada com 1,6 mM de TMB (tetrametilbenzidina), 80 mM de tampão de fosfato de sódio e 0,3 mM de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M e as absorbâncias medidas a 450 nm em espectrofotômetro. As leituras de densidade óptica (DO) de cada amostra foram comparadas com as de uma curva padrão de neutrófilos preparada a partir de uma suspensão celular obtida da cavidade peritoneal de camundongos inoculados com carragenina, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em atividade de mieloperoxidase por quantidade de neutrófilos na pata (Schneider and Issekutz, 1996).

4.6.4 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético

Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER, 1959). Grupos de camundongos BALB/c (n= 6) foram pré-tratados por via subcutânea com PBS (grupo controle negativo 0,1mL/10g), ácido acetilsalicílico (grupo controle positivo, 100mg/kg) ou extratos de *C. baccatum* na dose de 100 mg/kg. Após 15 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via intraperitoneal uma injeção de ácido acético (0,8%, 0,1mL/10g) e logo após foram

colocados individualmente em funis de vidro para avaliação da resposta nociceptiva. Neste método, a resposta nociceptiva é caracterizada por contorções da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores. O resultado é expresso em número de contorções, quantificadas cumulativamente durante um período de 30 minutos após o estímulo com ácido acético.

4.6.5 Hiperalgisia térmica induzida pela injeção intraplantar de carragenina

A avaliação da atividade antinociceptiva de *C. baccatum* sobre a hiperalgisia térmica foi conduzida somente com o extrato diclorometano, que obteve melhor resposta no ensaio de contorções por ácido acético. O ensaio de hiperalgisia térmica consiste em colocar os animais sobre uma placa quente após injeção intraplantar de um estímulo hiperalgésico, como a carragenina, e o comportamento do animal de pular, sacudir ou lamber a pata injetada sobre a placa é considerado como indicativo de hiperalgisia térmica. A latência para o aparecimento desta resposta, cronometrada em segundos, pode ser considerada como indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico. Antes da injeção da carragenina (500 µg/pata) os animais foram colocados individualmente sobre a placa, previamente aquecida a 46-48°C, para a obtenção de valores basais. Um tempo de corte de 15 segundos foi utilizado para minimizar danos ao tecido. Após um intervalo de 30 minutos os animais foram então pré-tratados por via subcutânea com PBS (controle negativo), com o extrato diclorometano (100 mg/kg) ou com indometacina (5mg/kg; controle positivo). A injeção de carragenina (500 µg/pata) foi administrada nas patas dos animais após 30 minutos dos tratamentos. A avaliação da resposta hiperalgésica de cada animal sobre a placa quente foi determinada nos tempos de 60, 120 e 180 minutos após o estímulo com a carragenina, com permanência máxima de 15 segundos na placa por animal. O tempo que o animal levou para pular, sacudir ou lamber a pata foi cronometrado em segundos e o resultado expresso como tempo de latência da resposta térmica.

4.6.6 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina

Para avaliar se o extrato diclorometano de *C. baccatum* apresenta atividade antinociceptiva via mecanismos centrais foi conduzido o modelo de nociceção induzido pela formalina (Hunskaar e Hole, 1987). Grupos de camundongos BALB/c (n= 6) foram pré-tratados por via subcutânea com PBS (grupo controle negativo 0,1mL/10g), morfina (grupo controle positivo, 5 mg/kg) ou extrato diclorometano na dose de 100 mg/kg. Após 30 minutos, os animais receberam na pata direita traseira por via intraplantar uma injeção de 50 µL de PBS (control negativo) ou formalina 2,5% dissolvida em PBS. Logo após o estímulo nociceptivo, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e com um cronômetro foi contabilizado o tempo (em segundos) gasto pelos animais com lambidas e/ou mordidas nas patas, indicativos de dor. Os animais foram observados durante 30 minutos e a contagem foi avaliada em duas etapas: primeiros 5 minutos (primeira fase) e entre 15 e 30 minutos (segunda fase) após a injeção da formalina.

4.7 Ensaio *in vitro*

4.7.1 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos a partir da cavidade abdominal de camundongos BALB/c inoculados por via intraperitoneal com uma solução estéril de tioglicolato 3% (2,0 mL/animal). Após 3 dias da inoculação os animais foram eutanasiados e 5 mL de meio DMEM foram injetados por via intraperitoneal. Os abdomens dos animais foram cuidadosamente massageados, a suspensão celular foi aspirada e centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos. O *pellet* formado foi ressuspenso em DMEM e uma alíquota desta suspensão celular foi usada para contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico, para então seguir com os próximos ensaios.

4.72 Ensaio da viabilidade celular pelo método de MTT

Para avaliar se os extratos de *C. baccatum* poderiam afetar a viabilidade celular, antes de conduzir os experimentos *in vitro*, os macrófagos foram submetidos ao método de redução do MTT (Mosmann, 1983). Este ensaio colorimétrico se baseia na redução do MTT (roxo) a formazan, um produto amarelado formado pela ação de enzimas mitocondriais em células vivas. Macrófagos peritoneiais obtidos conforme descrito anteriormente foram semeados em placas de 96 poços (2×10^5 células/0,2 mL/poço) em DMEM e incubados por 24 h em estufa a 37°C. Após remoção das células não aderentes, os macrófagos foram incubados por 48 h com DMEM ou extratos de *C. baccatum* dissolvidos em meio de cultura em concentrações de 3, 30, 100 e 300 µg/mL. Após esse período de tratamento, o sobrendante foi removido por aspiração e 10 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e meio de cultura foram adicionadas em cada poço e as células foram incubadas por 4 h a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) em cada poço para solubilizar os cristais de formazan e as leituras das densidades ópticas (D.O) foram lidas em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados obtidos em D.O foram transformados em percentual de viabilidade celular e comparados às amostras controle não tratadas.

4.73 Estimulação de macrófagos peritoneais e RAW 264.7 com carragenina ou LPS + IFN-γ

Para avaliar os efeitos dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção de óxido nítrico (NO) e a citocina TNF-α por macrófagos, estas células foram estimuladas com carragenina ou LPS + IFN-γ. Macrófagos peritoneais e macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram semeados em placas de 24 poços (5×10^5 células/mL/poço) em DMEM e incubados por 24 h em estufa a 37°C. Após a remoção das células não aderentes, os macrófagos foram incubados por 24 h com DMEM ou com os extratos dissolvidos em meio de cultura em concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL. Após o período de tratamento, o sobrendante foi removido por aspiração e as células foram estimuladas com carragenina 1000 µg/mL ou com uma combinação de LPS 10 ng/mL e IFN-γ 1ng/mL, solubilizados em DMEM. Após 24 h

dos estímulos, alíquotas do sobrenadante foram armazenadas em freezer a -80 °C para posterior análise da produção de óxido nítrico e TNF- α .

4.74 Análise da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais e macrófagos RAW 264.7

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais e RAW estimulados com carragenina ou LPS + IFN- γ pelo método de Griess (Green *et al.*,1982). Neste ensaio colorimétrico a medida de NO, cujo tempo de meia vida é muito curto, é determinada pela formação de nitrito (NO₂⁻) na amostra que durante a reação forma um composto estável de coloração púrpura. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm e as concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO₂. Os resultados foram expressos em micromolar (μ M) de NO₂.

4.75 Análise da produção de TNF- α por macrófagos peritoneais

O conteúdo da citocina pró-inflamatória TNF- α foi determinado nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN- γ . A análise foi realizada por meio de um kit de ELISA (eBioscience, USA), conforme as instruções do fabricante, usando um leitor de microplaca.

5. Análise estatística

Os dados foram analisados através de ANOVA de uma via seguido do teste Bonferroni utilizando o *software* GraphPad Prism 5.01. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todos os experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes e em quadruplicata.

Resultados

6. Resultados

6.1 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a migração de leucócitos e neutrófilos no modelo de peritonite induzido por carragenina em camundongos

A figura 3 mostra que a indução de peritonite com o estímulo inflamatório carragenina (Cg) (500 µg/cavidade, i.p.) provocou um aumento significativo no número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal dos camundongos, quando comparado com a quantidade basal de células dos animais que receberam apenas PBS (Fig. 3 A-D). Após a contagem diferencial, observou-se que a maioria das células que migraram eram neutrófilos (Fig. 3 E-H). Os animais que receberam o pré-tratamento com os extratos de *C. baccatum* (extrato etanólico, diclorometano, butanólico e resíduo aquoso) nas doses de 50 a 300 mg/kg s.c. apresentaram significativa redução no número de leucócitos totais e neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo controle carragenina. Como esperado, os animais pré-tratados com o anti-inflamatório esteroide dexametasona, também apresentaram redução no número de células recrutadas. Os resultados apresentados não demonstraram um efeito dose-dependente (Fig. 3). Como todos os extratos foram capazes de inibir o recrutamento de neutrófilos, outro experimento independente foi realizado somente com a dose 100 mg/kg, s.c., a fim de comparar a potência entre eles. A figura 4 mostra que todos os extratos inibiram de forma similar o número de leucócitos e neutrófilos, não apresentando, portanto, diferença significativa de potência entre eles. Os extratos etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso (100 mg/kg, s.c.) inibiram a infiltração de leucócitos para a cavidade peritoneal na ordem de 34,6%, 25%, 23,5% e 49,4% respectivamente (Fig. 4A), e a infiltração de neutrófilos em 36,4%, 36,4%, 42,3% e 56,4% respectivamente (Fig. 4B), quando comparados com o grupo controle carragenina (Cg).

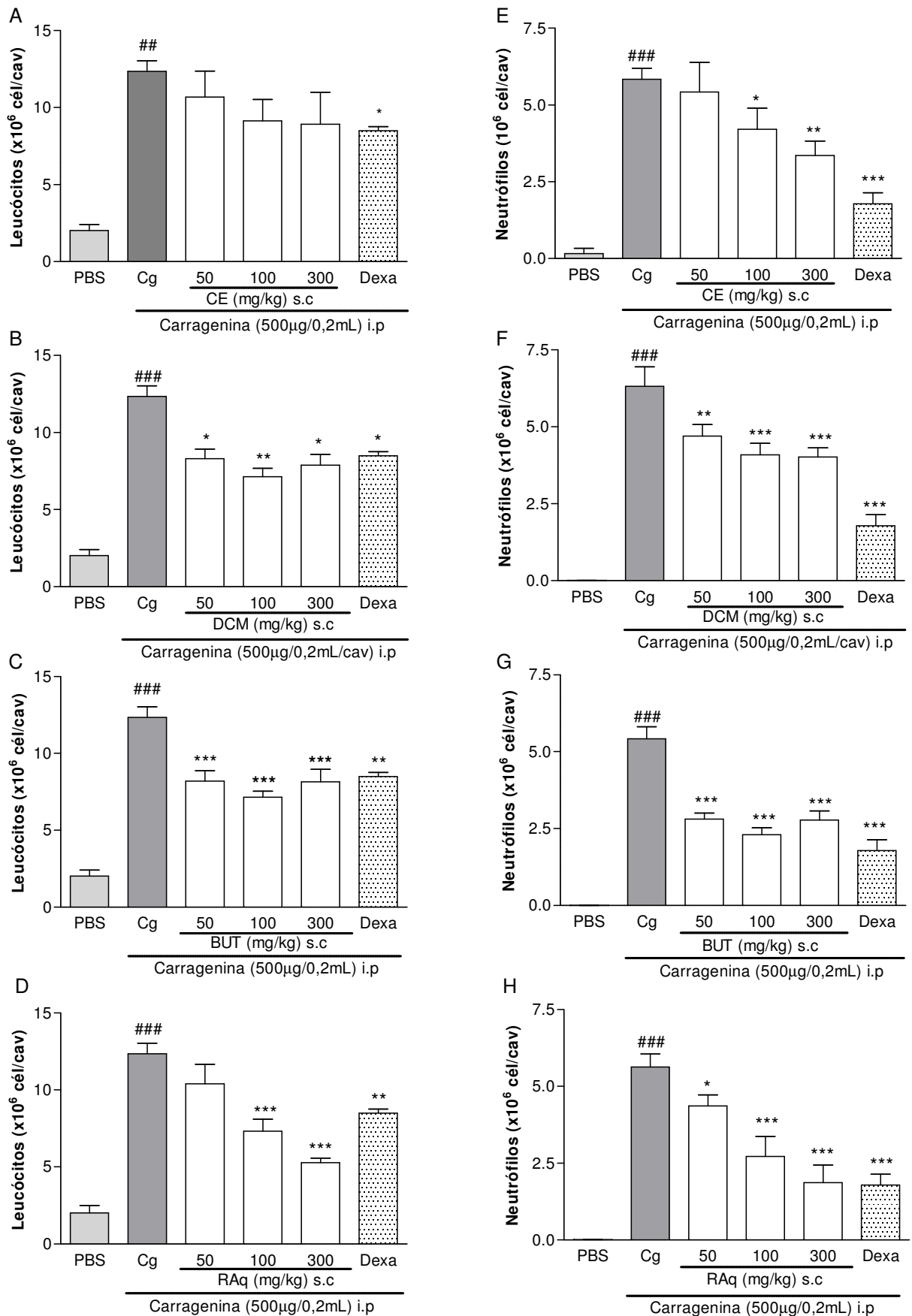


Figura 3. Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas doses de 50, 100 e 300 mg/kg (s.c) e Dexametasona (2,0 mg/kg, v.o) sobre a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos estimulados com carragenina. Diferença significativa em relação ao grupo Cg: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e em relação ao grupo PBS: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

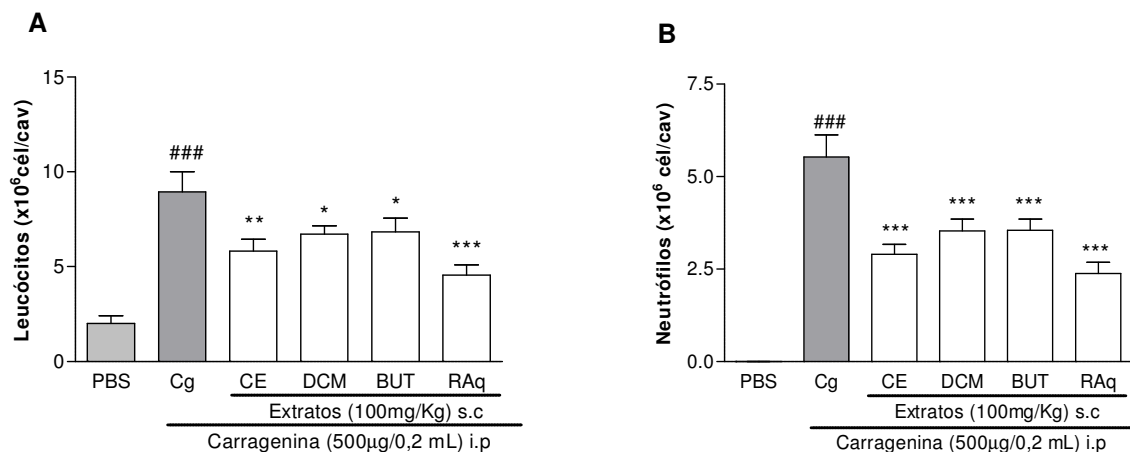


Figura 4. Avaliação da potência entre os extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100 mg/kg, sobre a migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos estimulados com carragenina. Diferença significativa em relação ao grupo Cg: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e em relação ao grupo PBS: ### $p < 0,001$.

6.2 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre o edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E2 e histamina em camundongos

A figura 5 mostra os efeitos dos extratos de *C. baccatum* (100 mg/kg) na resposta edematogênica induzida pelos estímulos inflamatórios carragenina (500 µg/pata), prostaglandina E₂ (5 µg/pata) e histamina (100 µg/pata) em patas de camundongos. Conforme a figura 5A, os animais que não foram tratados com os extratos, apresentaram um aumento significativo no edema após 1,2, 3 e 4 horas do estímulo carragenina. O maior pico de edema observado no grupo controle foi após 3 h do estímulo, período em que os extratos etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso inibiram o edema formado de forma significativa em 30,5%, 34,8%, 50% e 63,6% respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Cg) (Fig 5B). A figura 5C mostra que o pico da resposta edematogênica após o estímulo intraplantar de prostaglandina E₂ (PGE₂) foi em 15 minutos e que nos tempos seguintes avaliados (30, 60 e 90 min) o edema foi gradualmente reduzindo. Durante o pico do edema (15 min), os extratos diclorometano, butanólico e aquoso apresentaram uma inibição da resposta edematogênica em 23,1%, 38,4% e 68,6% respectivamente, quando comparado ao grupo controle não tratado (PGE₂) (Fig 5D). A administração de histamina na pata dos camundongos provocou um pico de resposta edematogênica após 30 minutos (Fig 5E) do estímulo e neste tempo apenas os extratos butanólico e aquoso foram capazes de inibir o edema em 46% e 56,5% respectivamente quando comparado ao grupo controle não tratado (Hist) (Fig 5F).

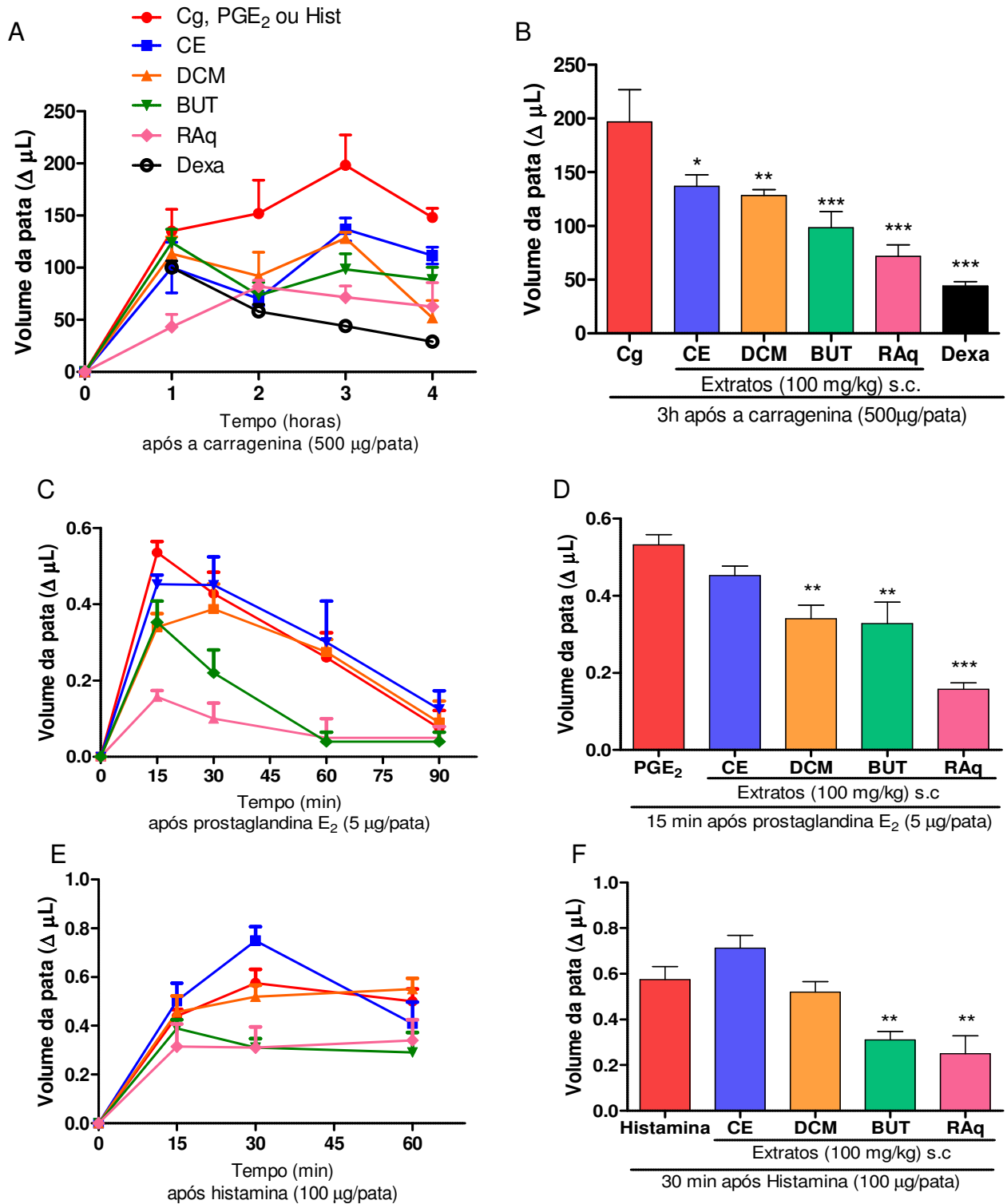


Figura 5. Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100mg/kg (s.c) e Dexametasona (Dexa, 2,0 mg/kg, v.o) sobre o edema de pata induzido pela carragenina (Cg), prostaglandina E₂ (PGE₂) e histamina (Hist) em camundongos. Diferença significativa em relação aos grupos controles (Cg, PGE₂ e Histamina): * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

6.3 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas injetadas com carragenina em camundongos

A atividade da mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos dos neutrófilos foi analisada em patas de camundongos injetadas com carragenina, como indicativo de infiltração de neutrófilos para o tecido inflamado. A Figura 6 mostra atividade da MPO nas patas, expressa em número de neutrófilos infiltrados no tecido. O grupo de animais controle carragenina, que não recebeu tratamento com os extratos apresentou elevada atividade de MPO, representada por uma infiltração de neutrófilos de cerca de $2,3 \pm 0,21 \times 10^4$ células/pata. Os animais tratados com os extratos etanólico, diclorometano, butabólico e aquoso, apresentaram significativa redução na atividade de MPO, em 39,6%; 42,4%; 83,3% e 66,7%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Cg). (Fig 6).

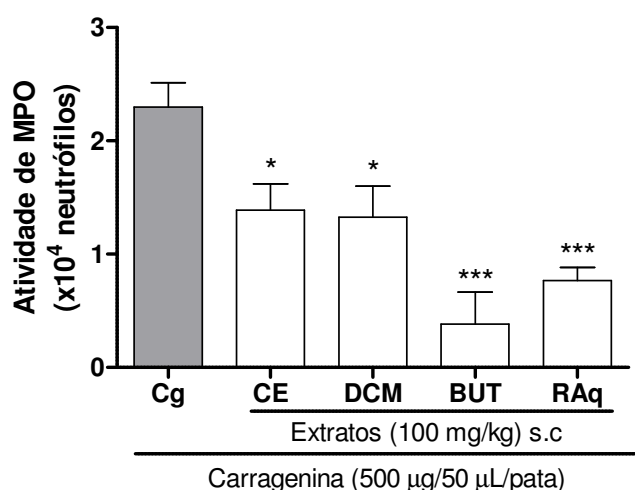


Figura 6: Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na dose de 100 mg/kg, sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas de camundongos injetadas com carragenina.

Diferença significativa em relação ao grupo Cg: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

6.4 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos

A figura 7 mostra os efeitos dos extratos de *C. baccatum* sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético através do número de contorções abdominais provocada por este estímulo nos animais. O grupo de animais controle, não tratado, apresentou aproximadamente 40 contorções durante os 30 minutos contabilizados, enquanto que os animais tratados com o analgésico ácido acetil salicílico (AAS, 100 mg/kg), como esperado, apresentaram inibição no número de contorções. O pré-tratamento com os extratos Etanólico, Butanólico e Aquoso na dose de 100 mg/kg não afetou a nocicepção induzida pelo ácido acético, porém o extrato diclorometano reduziu em 88% o número de contorções abdominais, quando comparado ao grupo controle (Fig 7).

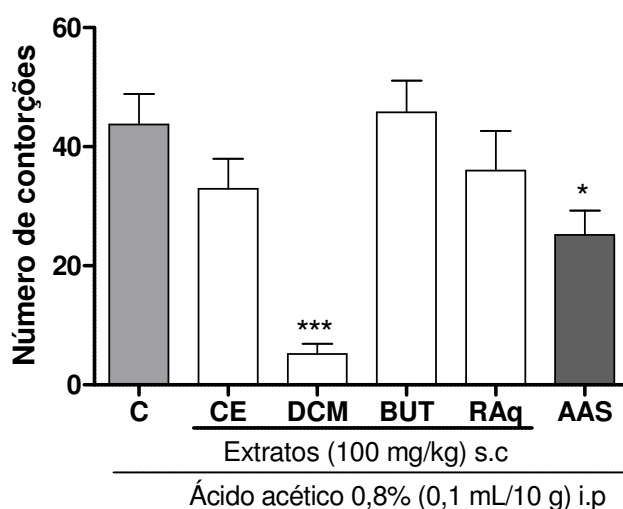


Figura 7: Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) e do ácido acetil salicílico (AAS) na dose de 100 mg/kg, sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.

Diferença significativa em relação ao grupo controle (C): * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

6.5 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a hiperalgesia térmica induzida pela injeção intraplantar de carragenina

A figura 8A mostra a progressão da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina (500 µg/pata) quando os animais foram colocados sobre a placa quente. Os animais que receberam apenas PBS nas patas apresentam em média um tempo de latência em torno de 14 segundos sobre a placa em todos os tempos analisados, enquanto que o grupo controle que recebeu carragenina na pata apresentou uma redução significativa no tempo de latência ($8,8 \pm 2,54$ segundos) após 60 minutos da indução, quando comparado com o grupo PBS, indicando uma resposta hiperagésica (Fig. 8A). Os animais pré-tratados com o extrato diclorometano (300 mg/kg) apresentaram um tempo de latência de 15 segundos após 60 minutos da injeção intraplantar da Cg, ou seja, o extrato foi capaz de prevenir a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina. O analgésico indometacina (5mg/kg) apresentou resposta semelhante ao extrato (Fig. 8B).

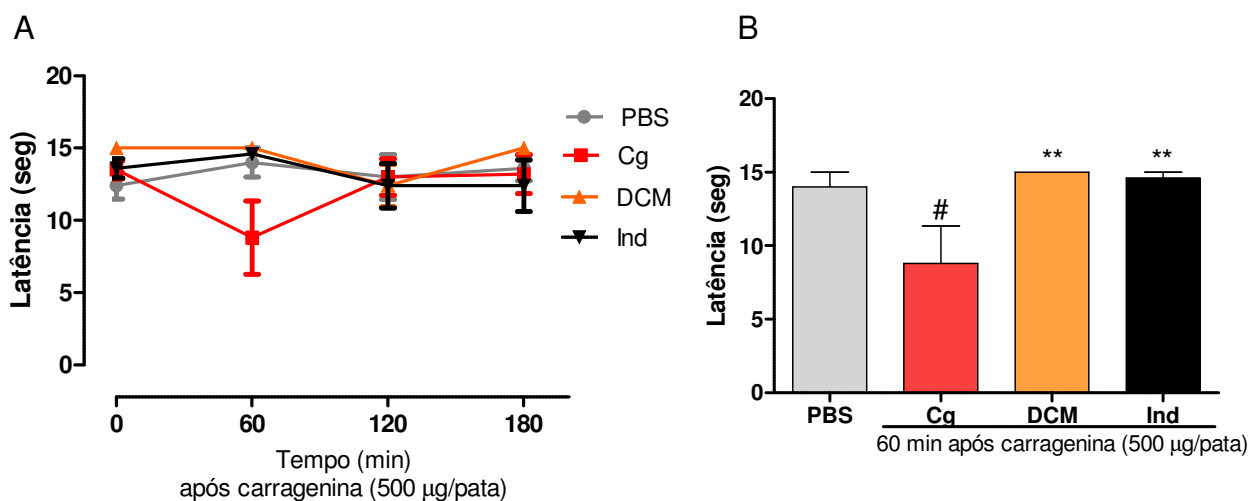


Figura 8. Efeito do extrato diclorometano (DCM, 100 mg/kg) de *C. baccatum* e da indometacina (Ind) sobre a hiperalgesia térmica induzida pela injeção de carragenina em pata de camundongos. Diferença significativa em relação ao grupo Cg: ** $p < 0,01$.

6.6 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata de camundongos

O efeito do extrato diclorometano sobre a nocicepção em nível de SNC foi avaliado no ensaio da formalina, no qual, o comportamento de lamber e/ou morder a pata é indicativo de dor. A figura 9 mostra que o extrato diclorometano na dose de 100 mg/kg foi capaz de inibir em 67,3 % a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na pata, durante a primeira fase (neurogênica). Na segunda fase (inflamatória) a inibição foi de 100%, os animais pré-tratados com o extrato não apresentaram qualquer manifestação de dor, através de lambidas ou mordidas nas patas, após a injeção da formalina. O analgésico opióide morfina (5mg/kg), como esperado, inibiu as duas fases da nocicepção induzida pela formalina quando comparado ao grupo controle em cada fase.

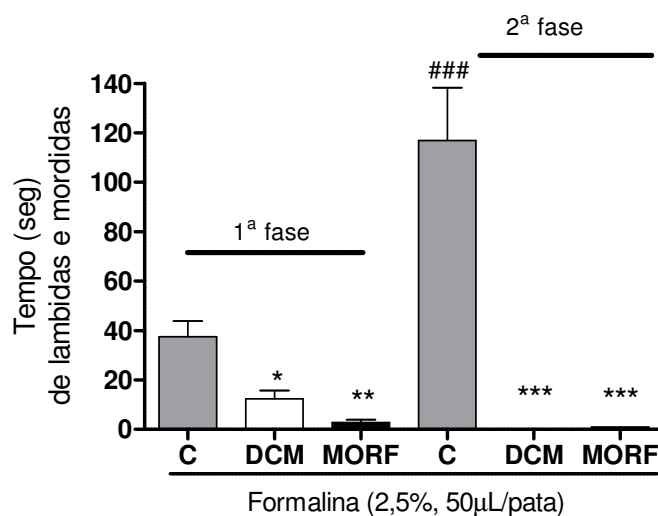


Figura 9. Efeito do extrato diclorometano (DCM, 100 mg/kg) de *C. baccatum* e da morfina (MORF) sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina em pata de camundongos. Diferença significativa em relação ao grupo controle (C): * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

6.7 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais

A figura 10 mostra que após 48 horas de tratamento nenhuma das concentrações testadas (3-300 μ g/mL) dos extratos de *C. baccatum* interferiram com a viabilidade dos macrófagos peritoneais, quando comparado ao grupo controle.

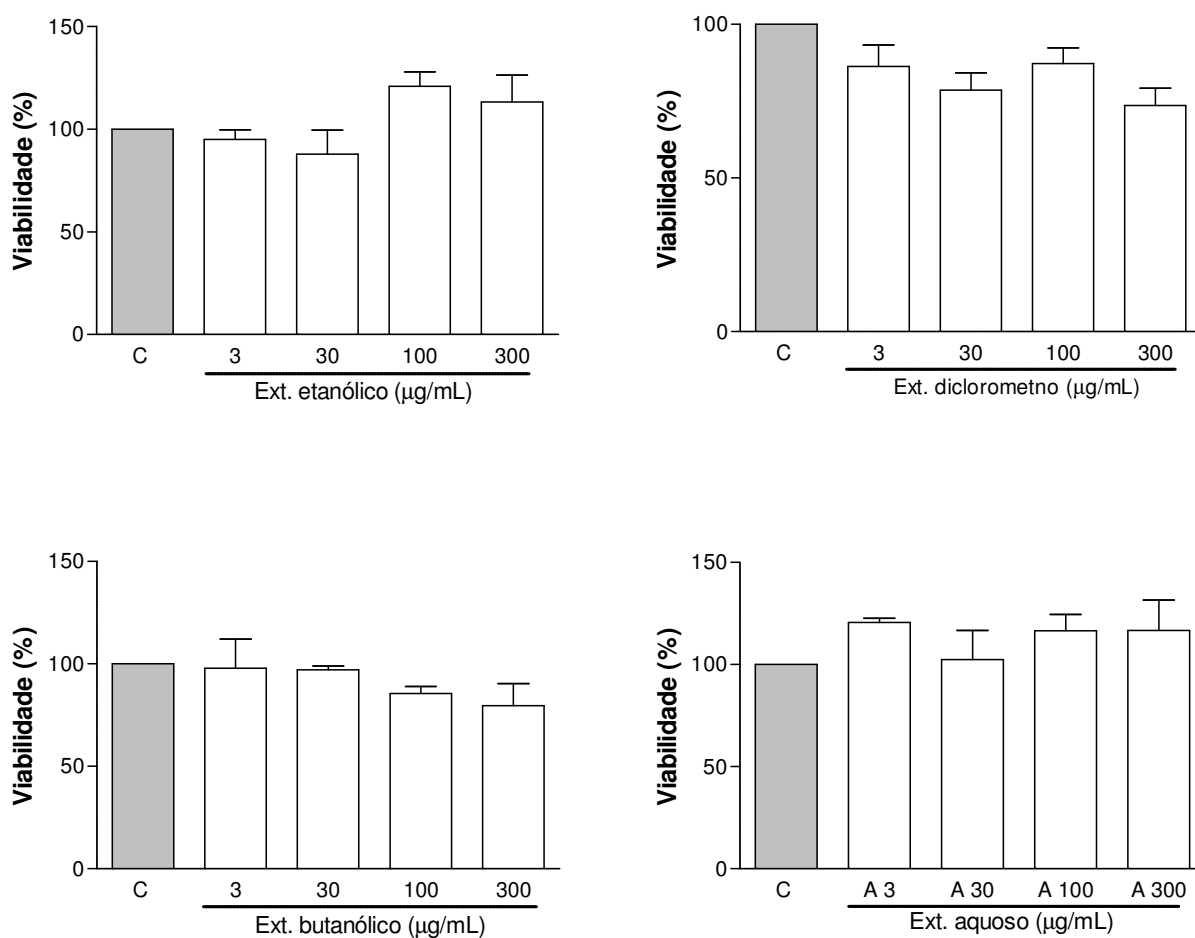


Figura 10. Efeito dos extratos etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso de *C. baccatum* nas concentrações de 3, 30, 100 e 300 μ g/mL sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais.

6.8 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com carragenina

O óxido nítrico é um importante mediador inflamatório e para avaliar se os extratos de *C. baccatum* inibiriam a sua produção, macrófagos peritoneais foram estimulados com carragenina (1000 µg/mL), o mesmo agente utilizado para induzir a inflamação nos modelos animais aqui testados. Os macrófagos peritoneais quando estimulados por 24 h com carragenina produziram níveis elevados de NO em relação aos níveis basais das células tratadas com o meio de cultura DMEM. O pré-tratamento dos macrófagos peritoneais por 24 h com os extratos de *C. baccatum* (30 – 300 µg/mL) reduziu significativamente os níveis de NO induzido por carragenina (Fig. 11)

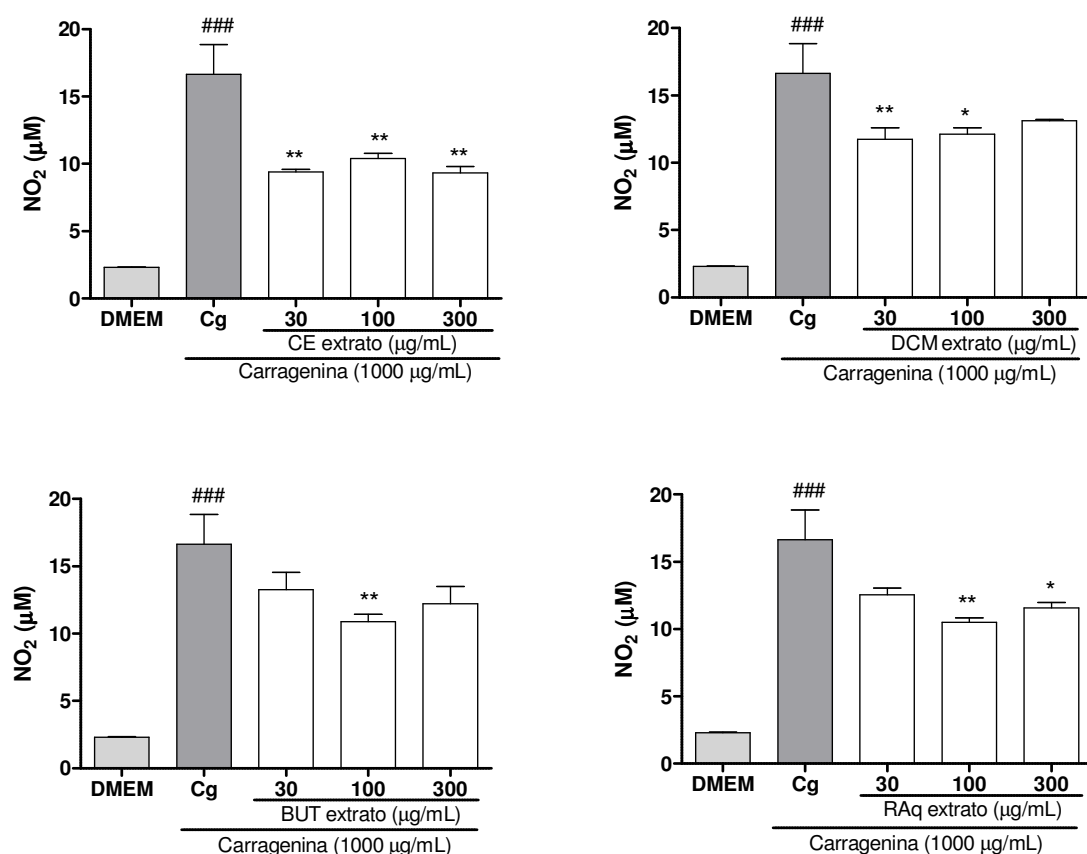


Figura 11. Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas concentrações de 30;100 e 300 µg/mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com carragenina. Diferença significativa em relação ao grupo Cg: * p < 0,05; ** p < 0,01 e em relação ao DMEM: # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001.

6.9 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais e RAW estimulados com LPS e IFN- γ

O efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção de NO também foi investigado em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ , dois estímulos indutores da produção de NO. Neste ensaio, além de macrófagos peritoneais, macrófagos da linhagem RAW também foram estimulados por 24 h com LPS (10 ng/mL) e IFN- γ (1 ng/mL) (Fig. 12). Após o estímulo, observou-se que os macrófagos da linhagem RAW produziram níveis mais elevados de NO (Fig. 12 E-H), que os macrófagos peritoneais (Fig. 12 A-D), quando comparado com o nível basal produzido pelas células tratadas com meio (DMEM). O pré-tratamento das células com os extratos de *C. baccatum* (30-300 μ g/mL) por 24 h reduziu os níveis de óxido nítrico induzido por LPS e IFN- γ . A inibição de NO provocada pelos extratos foi mais evidente nos macrófagos peritoneais (Fig. 12 A-D) do que nas células de linhagem quando comparado com o grupo controle (Fig.12 E-H).

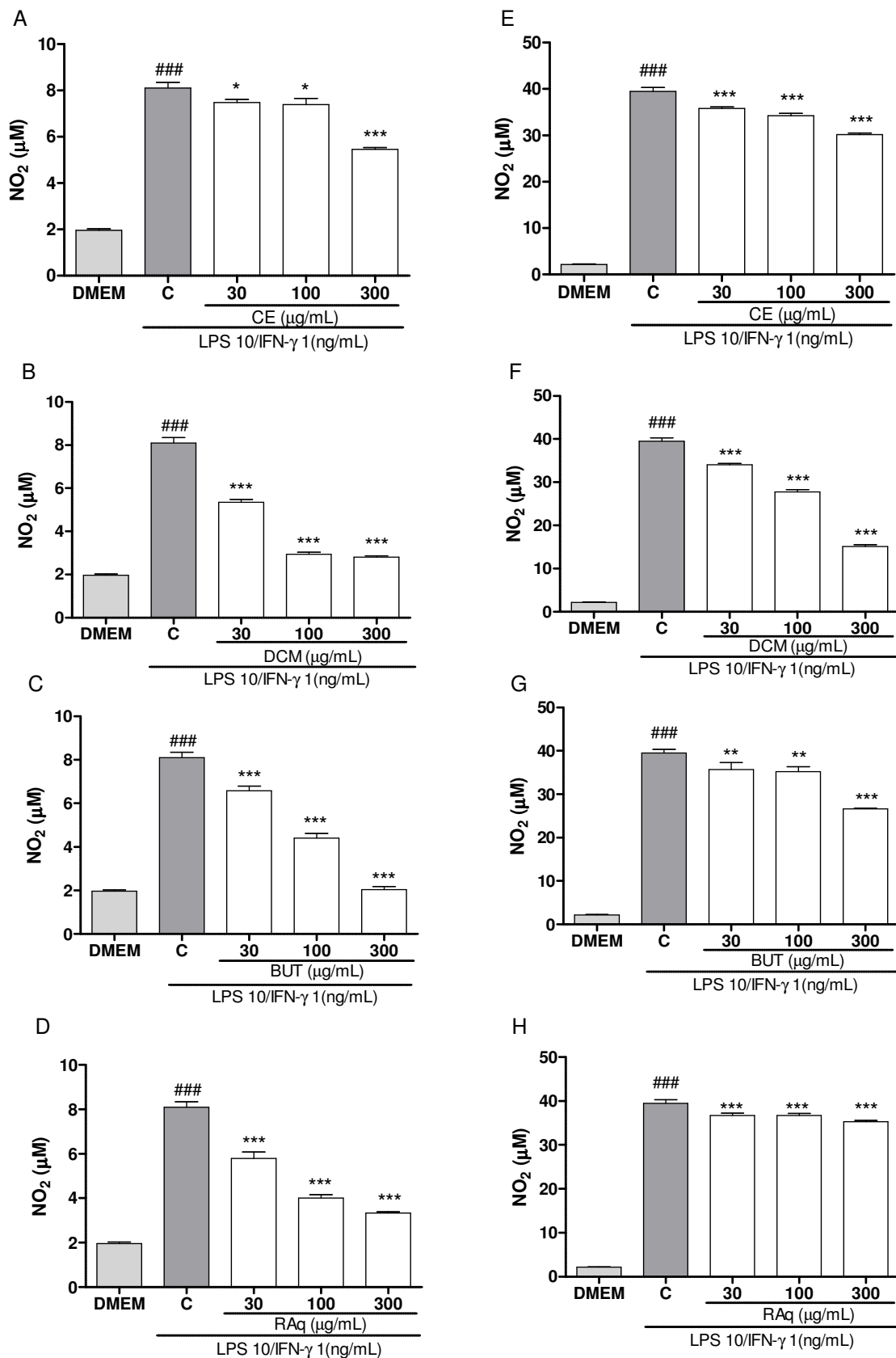


Figura 12. Efeito dos extratos de *C. bacatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais (8 A-D) e macrófagos da linhagem RAW 264.7 (8 E-H) estimulados com LPS 10 ng/mL e IFN-γ 1 ng/mL.

Diferença significativa em relação ao grupo controle (C): * p < 0,05; *** p < 0,001 e em relação ao grupo DMEM: # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001.

6.10 Efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais com LPS e IFN- γ

A estimulação de macrófagos com LPS (10 ng/mL) e IFN- γ (1 ng/mL) também induz a produção de TNF- α , uma das citocinas pró-inflamatórias envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. O estímulo com LPS/IFN- γ por 24h provocou um significativo aumento na produção de TNF- α pelos macrófagos quando comparado com as células tratadas apenas com meio (DMEM). O pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com os extratos etanólico, diclorometano e aquoso de *C. baccatum* por 24 h foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de TNF- α induzido por LPS e IFN- γ (Fig. 13).

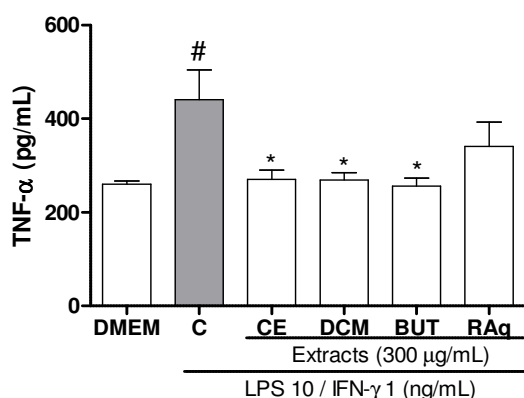


Figura 13. Efeito dos extratos de *C. baccatum* (CE: etanólico, DCM: diclorometano, BUT: butanólico, RAq: aquoso) na concentração de 300 μ g/mL sobre a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS 10ng/m + IFN γ 1ng/mL. Diferença significativa em relação ao grupo controle (C): * p < 0,05 e em relação ao grupo DMEM: # p < 0,05.

Discussão

7. Discussão

Capsicum baccatum L. var. *pendulum* conhecida popularmente como pimenta dedo-de-moça é uma das espécies de pimentas mais consumidas no Brasil e apesar disso há poucos relatos na literatura científica sobre suas propriedades farmacológicas, principalmente anti-inflamatória e antinociceptiva (KAPPEL *et al.*, 2008; SPILLER *et al.*, 2008, ZIMMER *et al.*, 2012). Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos de extratos provenientes dos frutos de *C. baccatum*, utilizando modelos de inflamação e nocicepção *in vivo* em camundongos e modelos *in vitro* usando cultura de macrófagos.

A inflamação e a sensação de dor são funções extremamente necessárias ao corpo para protegê-lo contra danos teciduais e infecções. A inflamação aguda é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular que resulta no extravasamento de fluídos e proteínas e infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos para o sítio inflamatório. Além disso, diversos mediadores inflamatórios são liberados, como as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-10) e interferon gama (INF- γ); bem como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico, sendo muitos deles capazes de provocar dor (MEDZHITOV, 2008; SHAIKH *et al.*, 2011; CHOVIATIYA e MEDZHITOV *et al.*, 2014).

Para a avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória dos extratos de *C. baccatum*, utilizou-se neste trabalho os modelos de peritonite induzido por carragenina (Cg) e edema de pata induzido por Cg, prostaglandina E₂ e histamina.

A peritonite induzida por carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda e empregado largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificação e correlação da migração celular e do exsudato inflamatório. A carragenina é um polissacarídeo derivado de algas marinhas da classe das *Rhodophyceae* e a inflamação aguda induzida por ela em modelos animais de peritonite e edema provoca aumento da permeabilidade vascular com consequente infiltração celular para o tecido, principalmente de neutrófilos. Provoca também liberação de uma série de mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina, prostaglandina E₂, citocinas IL-1 β e TNF- α , além de

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Posadas *et al.*, 2004; LORAM *et al.*, 2007; NECAS e BARTOSIKOVA, 2013).

O presente trabalho mostrou que os animais pré-tratados por via subcutânea, com os extratos de *C. baccatum* (extrato etanólico, diclorometano, butanólico e resíduo aquoso) nas doses de 50 a 300 mg/kg apresentaram significativa redução no número de leucócitos totais e neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal, após o estímulo intraperitoneal da carragenina. Como todos os extratos foram capazes de inibir a migração celular sem, contudo apresentarem um efeito dose-dependente realizou-se um novo experimento de peritonite com a administração dos extratos somente em uma dose (100 mg/kg, s.c.), a fim de comparar a potência entre eles. Os resultados demonstraram que todos os extratos inibiram de forma similar o número de leucócitos e neutrófilos para a cavidade, não apresentando, portanto, diferença significativa de potência entre eles.

Esses dados corroboram em parte com os resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo Zimmer *et al.* (2012) testaram os mesmos extratos de *C. baccatum* (200 mg/kg), por via oral, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos e demonstrou que apenas os extratos etanólico e butanólico reduziram a infiltração celular para a cavidade pleural. É importante notar que os extratos diclorometano e aquoso apresentam propriedades apolares e polares respectivamente, as quais podem interferir nas etapas farmacocinéticas quando administrados por via oral, o que poderia justificar a ausência dos efeitos desses extratos no trabalho de Zimmer *et al.* (2012).

Juntamente com a migração celular para o local da lesão, a formação de edema decorrente do aumento da permeabilidade vascular constitui mais uma característica do processo inflamatório agudo. Então, para avaliar se os extratos de *C. baccatum* também interferiam na resposta edematogênica avaliou-se o efeito dos extratos no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Este modelo experimental de inflamação aguda é caracterizado por duas fases. Na fase inicial (1-2 h) logo após a injeção da carragenina, o edema gerado é mediado por histamina e serotonina. Na fase mais tardia, a permeabilidade vascular é mantida pela ação das prostaglandinas, associada à migração de leucócitos para a região inflamada, assim como outros mediadores, como cininas, óxido nítrico e citocinas (MORRIS *et al.*, 2003; POSADAS *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006; LORAM *et al.*, 2007).

O presente estudo demonstrou que todos os extratos de *C. baccatum* (100mg/kg, s.c.) reduziram de forma significativa o edema de pata induzido por carragenina após 3 h do estímulo, sugerindo uma possível ação de *C. baccatum* nos mediadores inflamatórios acima citados. Assim, avaliou-se o efeito dos extratos de *Capsicum* sobre o edema de pata induzido por histamina e prostaglandina E₂ em camundongos. Os resultados mostraram que os extratos de *C.baccatum* (100 mg/kg s.c) foram capazes de inibir o edema de pata induzido tanto por prostaglandina E₂ (PGE₂) como por histamina.

Como descrito anteriormente, a resposta edematogênica também é acompanhada pela infiltração de neutrófilos para o local da lesão. Assim, para avaliar os efeitos de *C. baccatum* sobre o recrutamento de neutrófilos para o tecido da pata inflamada por injeção de carragenina, foi conduzido o ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO). Esta enzima é secretada por neutrófilos nos sítios inflamatórios podendo levar a danos teciduais e contribuir para a patogênese da inflamação, sendo, portanto, muito utilizada como um marcador da infiltração de neutrófilos (BRADLEY *et al.*, 1982; FAURSCHOU *et al.*, 2003). Os resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com os extratos de *C. baccatum* (100 mg/kg s.c) reduziu de forma significativa os níveis de atividade da MPO no tecido das patas, corroborando com o efeito inibitório dos extratos sobre a migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Estes dados indicam que no modelo de edema de pata induzido por carragenina o efeito anti-edematogênico dos extratos de *C. baccatum* pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a redução da migração de neutrófilos e com a inibição de alguns mediadores inflamatórios como a PGE₂ e histamina no sítio inflamatório.

Muitos mediadores inflamatórios liberados no local da lesão são capazes de sensibilizar as terminações nervosas e desencadear a dor inflamatória, portanto, tendo em vista a atividade anti-inflamatória dos extratos, avaliou-se a possível atividade antinociceptiva dos extratos de *C.baccatum* utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. A administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de muitos mediadores presentes no processo inflamatório, como as citocinas (IL-1 β , IL-8, TNF- α), prostaglandinas, bradicina, entre outros e por isso, este modelo é considerado um típico modelo de nocicepção

inflamatória visceral (KOSTER *et al.*, 1959; SANDKÜHLER, 2009; BORGES *et al.*, 2013).

Antes do estímulo nociceptivo todos os animais foram pré-tratados com os extratos de *C. bacctum* (etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso) na dose de 100 mg/kg s.c., porém, apenas o extrato diclorometano apresentou atividade antinociceptiva. Por outro lado, em relação ao efeito anti-inflamatório, todos os extratos mostraram atividade nos modelos testados. Desta forma, a ausência de atividade antinociceptiva dos extratos etanólico, butanólico e aquoso, sugere que talvez diferentes substâncias presentes nos extratos estejam mediando os efeitos através de mecanismos de ação distintos.

De fato, tanto o processo inflamatório, como a nocicepção inflamatória envolve uma série de mediadores e mecanismos orquestrados para que ocorra a resposta. As modificações funcionais que os mediadores inflamatórios provocam nos neurônios aferentes primários nociceptivos permitem o surgimento da hiperalgisia inflamatória, que se caracteriza por uma resposta exarcebada a um estímulo normalmente nocivo de baixa intensidade. Os principais mediadores inflamatórios hiperalgésicos são as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-8 que por sua vez, são responsáveis pela liberação das prostaglandinas, como a PGE₂ também hiperalgésica (VERRI *et al.*, 2006).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é um modelo clássico de formação de edema e hiperalgisia. Muitos estudos indicam que o aumento de PGE₂ mediado pela cicloxigenase-2 (COX-2) no sistema nervoso central contribui para a severidade da resposta inflamatória e dor neste modelo (GUAY *et al.*, 2004; NECAS e BARTOSIKOVA, 2013).

Para avaliar se o extrato diclorometano inibiria a resposta hiperalgésica foi realizado o teste de hiperalgisia térmica induzida pela injeção de carragenina na pata de camundongos. Quando comparados com os animais controle, que não foram tratados, os animais que receberam o extrato diclorometano (100 mg/kg) apresentaram um tempo de latência maior, tanto quanto os animais que não receberam o estímulo nociceptivo na pata, indicando que o extrato foi capaz de prevenir a resposta hiperalgésica causada pela carragenina.

A fim de entender melhor a ação antinociceptiva do extrato diclorometano, utilizou-se o modelo de nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata. A

formalina causa estimulação dos nociceptores o que caracteriza um modelo característico de dor persistente, além de ser considerado um modelo bifásico de comportamento indicativo de dor e por isso mais específico (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989; SANDKÜHLER, 2009).

A primeira fase (nocicepção neurogênica) inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, se estende por 5 minutos e é caracterizada pelo efeito irritante direto da formalina sobre os nociceptores que ativa as fibras aferentes primárias (predominantemente fibras C e em parte fibras A δ) acarretando a liberação de neuropeptídios tais como substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) em terminais periféricos e centrais. Esta primeira fase pode ser inibida por agonistas opióides, como morfina e fentanil, antagonistas dos receptores da bradicinina e dos receptores vanilóides (TRPV). A segunda fase (nocicepção inflamatória) é mediada pela combinação de estímulos periféricos e sensibilização da medula espinhal. Esta fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina na pata e é caracterizada pela liberação de vários mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas (BORGES *et al.*, 2013).

Os resultados apresentados mostraram que o extrato diclorometano inibiu as duas fases da nocicepção induzida pela formalina. Sugere-se então, que este extrato é capaz de agir em nível central, devido à inibição da fase neurogênica (primeira fase), além de inibir o processo nociceptivo em nível periférico devido à inibição da fase inflamatória (segunda fase), confirmando os resultados encontrados no modelo de nocicepção inflamatória induzida pelo ácido acético.

Desse modo, verificou-se que os extratos etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso de *C. baccatum* possuem propriedade anti-inflamatória, com redução da migração de neutrófilos e da resposta edematogênica e o extrato diclorometano também possui atividade antinociceptiva com inibição das duas fases do modelo da formalina.

Com o objetivo de compreender melhor os efeitos dos extratos de *C. baccatum* envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, realizou-se alguns experimentos *in vitro* utilizando cultura de macrófagos.

Para isso, fez-se necessário estabelecer concentrações ideais dos extratos, a fim de evitar o uso de concentrações excessivas que poderiam causar danos à

viabilidade celular. Utilizou-se então o método de redução do MTT para avaliar os efeitos dos extratos de *C. baccatum* sobre viabilidade celular e os resultados mostraram que todas as concentrações testadas não apresentaram efeito citotóxico para as células. Esses dados nos permitiram dar continuidade aos ensaios *in vitro* para avaliação do efeito dos extratos sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e NO.

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador responsável por diversos efeitos tanto fisiológicos como patofisiológicos no organismo. Em concentrações fisiológicas tem propriedades vasoprotetoras, pois causa vasodilatação, inibição da adesão de leucócitos e agregação plaquetária, além de propriedades antiproliferativa, antioxidante e microbicida (TOUSOULIS *et al.*, 2012; ANTOSOVA *et al.*, 2012).

Porém, durante o processo inflamatório, neutrófilos e macrófagos ativados por diferentes estímulos como interleucinas, TNF- α , IFN- γ , bactérias ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS) via indução da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzem grandes quantidades de NO, que pode ser citotóxico ao organismo, atribuído principalmente ao peroxinitrito (ONOO⁻) produzido a partir da reação entre o NO e o radical livre ânion superóxido (O₂⁻). Essa citotoxicidade está frequentemente associada a muitas doenças como artrite, esclerose múltipla, colite, psoríase, doenças neurodegenerativas, entre outras (PACHER *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; PAUTZ *et al.*, 2010). Por esses motivos, muitas pesquisas tem focado no controle da superprodução dos níveis de NO através da inibição da iNOS, com o intuito de desenvolver novos fármacos para o tratamento de doenças mediadas pelo NO (HESSLINGER *et al.*, 2009; JANAKIRAM e RAO, 2012).

Devido ao importante papel do óxido nítrico no processo inflamatório, o presente trabalho avaliou o efeito dos extratos de *C. baccatum* sobre a produção desse mediador por macrófagos estimulados com carragenina, LPS e IFN- γ .

Já está bem estabelecido na literatura que a carragenina é um potente agente inflamatório em modelos animais de inflamação, com liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandina E₂, TNF- α , NO entre outros (MORRIS *et al.*, 2003 e LORAM *et al.*, 2007). Os efeitos imunoestimulantes dos polissacarídeos decorrem principalmente da modulação de macrófagos, porém, enquanto alguns tipos de carragenina induzem potente ativação de macrófagos, outros parecem inibir suas

funções. Além disso, alguns trabalhos demonstram que polissacarídeos extraídos da alga verde aumentam a expressão de várias quimiocinas e interleucinas, além de estimular a liberação de prostaglandina E₂ e induzir um aumento na expressão de COX-2 e iNOS em macrófagos (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013).

Nossos resultados mostraram que macrófagos peritoneais estimulados por 24 h com carragenina produziram níveis elevados de NO, os quais foram inibidos pelo pré-tratamento das células com os extratos de *C. baccatum* (30-300 µg/mL).

O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas é considerado um dos mais potentes iniciadores da inflamação e responsável por ativar macrófagos e monócitos a liberarem citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6. Além disso, o LPS em combinação com citocinas como IFN- γ atua de modo sinérgico sobre a enzima iNOS em macrófagos resultando na produção de grandes quantidades de NO. A atividade da iNOS em macrófagos é primeiramente regulada e modulada por receptores celulares como receptores Toll-like e CD14. CD14 é um receptor para o LPS e parece ter um papel essencial na resposta inflamatória em monócitos e macrófagos através da ativação da via do fator nuclear-kB (NFkB) enquanto que a indução de iNOS por IFN- γ é via sinalização de Jak-STAT (JONES *et al.*, 2007; PAUTZ *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostraram que todos os extratos de *C. baccatum* (30 a 300 µg/mL) inibiram a produção de NO por macrófagos estimulados por LPS e IFN- γ . Essa inibição foi mais evidente nos macrófagos peritoneais comparada com RAW, talvez porque os níveis de NO produzidos por RAW tenham sido mais elevados, corroborando com dados obtidos por Huang *et al.*, (2011).

Estudos mostram que a biossíntese de NO é regulada por uma variedade de mecanismos em níveis de transcrição e pós-transcrição em macrófagos ativados e outras células, como a via do fator nuclear-kB (NFkB) (PAUTZ *et al.*, 2010), um fator de transcrição com papel crucial nos genes envolvidos em processos fisiológicos, bem como na resposta à lesão e infecção. A ativação dessa via por fosforilação e subsequente degradação de uma proteína inibidora (I κ B), leva a ativação da transcrição de genes para muitas proteínas pró-inflamatórias, tais como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12),

dentre outras, portanto a via NFkB é considerada como um potencial alvo de intervenção em doenças inflamatórias (LAWRENCE *et al.*, 2009).

O óxido nítrico possui efeitos bifásicos na sua síntese e pode ele mesmo regular sua própria produção por modulação da expressão de mRNA de iNOS. Baixas concentrações de NO (tais como as que ocorrem no início da estimulação dos macrófagos pelas citocinas) ativam NF-κB e upregulam (aumentam a expressão de) iNOS (“feedback” positivo), enquanto altas concentrações tem efeito oposto, que pode prevenir uma superprodução de NO. Enquanto a regulação do “feedback” negativo da expressão de iNOS pelo NO em macrófagos é mediada pela inibição da ativação de NF-κB, a molécula de H₂O₂, bem como espécies reativas de oxigênio ativam NF-κB com o aumento da expressão de iNOS e esta é suprimida por compostos antioxidantes e enzimas. Então a produção de H₂O₂ por LPS em macrófagos ativados participa na “upregulation” de iNOS (ZHEN *et al.*, 2008; WINK *et al.*, 2011).

De acordo com os resultados obtidos pode-se sugerir que os efeitos inibitórios de todos os extratos de *C. baccatum* sobre a produção de NO por macrófagos estimulados por LPS e IFN-γ seja em parte pela inibição de iNOS, através da inibição das vias NFkB ou Jak-STAT. Além disso, sugere-se que as propriedades antioxidantes presentes nos extratos (ZIMMER *et al.*, 2012) possam contribuir com a inibição da expressão de iNOS, já que estes compostos inibem a via NF-κB, conforme descrito acima. De fato, recentes estudos têm demonstrado que muitos componentes de plantas medicinais apresentam efeito inibitório sobre a expressão de iNOS em macrófagos ativados por LPS, através da “downregulation” de NF-κB (MIN-SANG *et al.*, 2012; SYAM *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; CHUN *et al.*, 2014).

Além do óxido NO produzido pela iNOS, muitos outros mediadores estão envolvidos na patogênese da inflamação, como a citocina TNF-α. O TNF-α é a principal citocina envolvida no recrutamento de neutrófilos durante a inflamação aguda e é considerada papel chave em várias doenças relacionadas com inflamação. Recentemente a citocina TNF-α tem ganhado destaque devido à eficácia dos anticorpos anti-TNF-α no tratamento de doenças autoimunes como artrite reumatóide, psoríase, espondilite anquilosante e doença de Crohn. Esses anticorpos não atravessam a barreira hemato-encefálica, atuando periféricamente e modificando os sintomas e progressão da doença. Em muitos pacientes eles têm

demonstrado ser efetivos, porém seus efeitos no alívio da dor ainda não estão bem esclarecidos (SIEBERT *et al.*, 2015; SEDGER e MCDERMOTT, 2014). Além disso, esta citocina também pode agir em receptores para TNF- α nos nociceptores produzindo a sensibilização, embora seus mecanismos moleculares ainda não estejam claros (CZESCHIKA *et al.*, 2008; HESS *et al.*, 2011).

Os resultados aqui apresentados mostraram que além da inibição da produção de NO, os extratos de *C. baccatum* também reduziram a produção de TNF- α por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ . Como descrito anteriormente, a via de sinalização da produção de TNF- α por macrófagos também envolve a ativação de NF-K β . Além disso, Medeiros *et al.* (2007) demonstraram a participação de citocinas inflamatórias como TNF- α na via de sinalização para a indução de iNOS, o que sugere que o efeito inibitório dos extratos na produção tanto de NO como TNF- α por macrófagos seja pela inibição da mesma via NF-K β .

Os resultados até aqui sugerem que os efeitos anti-inflamatórios apresentados por todos os extratos de *C. baccatum* sejam em parte pela inibição da migração de neutrófilos, bem como pela inibição dos mediadores inflamatórios aqui avaliados, como histamina e PGE₂ no modelo de edema de pata e NO e TNF- α produzidos por macrófagos. O efeito antinociceptivo apresentado apenas pelo extrato diclorometano pode ser em parte devido à inibição desses mediadores, os quais também são nociceptivos, porém, sugere-se que outros mecanismos estejam envolvidos com a participação de diferentes compostos ativos, presentes neste extrato.

As espécies de *Capsicum* são relatadas por apresentarem entre outros compostos, flavonóides e capsaicinóides como a capsaicina, descrita com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva devido à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, TNF- α , PGE₂ e óxido nítrico (LIU e NAIR, 2010; JOLAYEMI e OJEWOLE, 2013; KIM e LEE, 2014). Flavonóides e compostos fenólicos são em grande parte responsáveis pela atividade antioxidante e anti-inflamatória das plantas, eles podem inibir a produção de eicosanóides, como as prostaglandinas formadas a partir do ácido araquidônico pela ação da COX (MUELLER *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012). Os extratos utilizados neste trabalho foram obtidos previamente pelo nosso grupo (ZIMMER *et al.*, 2012) a partir dos frutos de *C. baccatum* e seguiram um fracionamento bioquímico com solventes de polaridades diferentes, originando: o extrato bruto etanólico, extrato diclorometano,

butanólico e aquoso. Todos os extratos foram analisados quimicamente por esses autores e apresentaram quantidades significativas de compostos fenólicos totais e flavonóides. No entanto, a caracterização por HPLC não identificou a presença de quercetina e rutina. A capsaicina, também analisada, foi encontrada somente nos extratos etanólico e diclorometano.

Portanto, os efeitos anti-inflamatórios apresentados neste trabalho por todos os extratos testados de *C. baccatum* podem ser devido também à presença de compostos fenólicos e flavonóides e não somente à capsaicina como indicam alguns autores. Assim, os efeitos antinociceptivos apresentados apenas pelo extrato diclorometano em nosso trabalho, podem ser atribuídos em parte, pela presença de capsaicina.

A atividade antinociceptiva do extrato diclorometano foi avaliada primeiramente através do modelo de nocicepção visceral inflamatória induzida pelo ácido acético. Neste modelo, a nocicepção é decorrente das diversas substâncias pró-inflamatórias liberadas, bem como pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam diretamente canais de cátions não seletivos, como os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) e receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) promovendo assim o início da dor visceral. A acidificação do tecido pode ocorrer em uma variedade de patologias e os prótons podem estar envolvidos na geração da dor inflamatória (COUTAUX *et al.*,2005).

A capsaicina é o agonista protótipo do receptor TRPV1 e estudos prévios tem demonstrado sua relevância na transmissão nociceptiva, principalmente porque ele é ativado por mediadores presentes nos tecidos adjacentes à lesão. TRPV1 é um canal iônico, ativado por estímulo térmico (≥ 42 °C), prótons e ligantes e claro pela capsaicina. O TRPV1 está localizado na periferia em fibras nociceptivas primárias do tipo C, bem como em fibras A, na medula espinhal, além de alguns sítios supraespinhais dentro do SNC, com possível envolvimento no processamento da dor. Um interessante fenômeno está associado aos efeitos opostos apresentados pela capsaicina após a sua aplicação. Embora seja bem estabelecido que a capsaicina possa causar dor e sensibilização tanto de nervos periféricos como centrais, sua ação pode também conduzir à dessensibilização. Tem sido descrito que a dessensibilização ocorre por mecanismo dose-dependente, onde doses baixas, repetidas ou uma única dose alta de capsaicina injetada ou tópica leva a

imediate dessensibilização, no entanto, uma única dose baixa pode causar a ativação (KENNEDY *et al.*, 2010; O'NEILL *et al.*, 2012). A dessensibilização pela capsaicina é um mecanismo complexo, ainda pouco compreendido, no entanto, apresenta potencial terapêutico.

Aplicação tópica de capsaicina tem demonstrado aliviar a dor neuropática, músculo-esquelética, dor na artrite, fibromialgia e psoríase entre outras. No entanto, a compreensão dos efeitos sistêmicos e centrais da capsaicina é limitada (KNOTKOVA *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2013; CHHABRA *et al.*, 2012). A capsaicina tem sido usada em muitos estudos para a investigação do seu papel em receptores TRPV1 supraespinhais, como por exemplo, a ativação do canal por mediadores endógenos dentro do sistema nervoso central (SNC). Comparado com a expressão de TRPV1 na periferia e na medula espinhal, acredita-se que em sítios supraespinhais o seu papel seja exclusivamente analgésico. A microinjeção da capsaicina dentro da região ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (PAG) demonstrou um efeito antinociceptivo em ratos. Esses dados sugerem que os efeitos analgésicos atribuídos à capsaicina seja devido a sua interação com as vias descendentes da modulação nociceptiva. Por outro lado, outros estudos demonstram que a injeção de capsaicina em PAG resulta de uma hiperalgesia anterior ao efeito analgésico, sugerindo que os efeitos antinociceptivos da capsaicina no SNC seja devido à dessensibilização de receptores TRPV1 (O'NEILL *et al.*, 2012).

Há poucos estudos que mostram os efeitos analgésicos para o gênero *Capsicum* (HERNÁNDEZ-ORTEGA *et al.*, 2012; JOLAYEMI e OJEWOLE, 2014), contudo, este trabalho demonstrou pela primeira vez a atividade antinociceptiva de *C. baccatum*. Sugere-se que a atividade analgésica apresentada pelo extrato diclorometano seja mediada pela capsaicina em receptores TRPV1, tanto em nível periférico como central, bem como pela inibição dos mediadores inflamatórios.

Conclusões

8. Conclusões

Concluimos através dos resultados obtidos que os quatro extratos de *C. baccatum* avaliados (etanólico, diclorometano, butanólico e aquoso) apresentam potencial anti-inflamatório, pois reduziram *in vivo* a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal bem como a formação de edema de pata em camundongos. O efeito anti-inflamatório observado pode ser devido em parte, pela inibição de mediadores pró-inflamatórios como PGE₂ e histamina no sítio inflamatório, já que os extratos, principalmente o butanólico e o aquoso amenizaram o edema de pata induzido por esses mediadores. Além disso, os extratos também inibiram *in vitro*, a produção por macrófagos, de TNF- α e óxido nítrico, moléculas importantes do processo inflamatório.

Apenas o extrato diclorometano apresentou atividade antinociceptiva. O extrato reduziu o número de contorções peritoneais induzidas por ácido acético, reduziu a nocicepção tanto em nível periférico como em nível central no modelo de nocicepção induzida por formalina e inibiu a hiperalgesia térmica induzida por carragenina. Os efeitos antinociceptivos em nível periférico observados pelo extrato diclorometano podem ser atribuídos à inibição dos mediadores inflamatórios acima citados.

Para melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, bem como para elucidação dos compostos responsáveis, experimentos adicionais devem ser realizados.

Referências

9. Referências

AIZAWA, K., INAKUMA, T. Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprica (*Capsicum annuum*), alters plasma high-density lipoprotein-cholesterol levels and hepatic gene expression in rats. **The British Journal of Nutrition** 102,1760–1766, 2009.

ALBRECHT E, ZHANG D, MAYS A.D, SAFTNER R.A, STOMMEL J.R .Genetic diversity in *Capsicum baccatum* issignificantly influenced by its ecogeographical distribution. **BMC Genetics** 13:68, 2012.

ANAND P, BLEY K. Therapeutic Potential and Mechanisms of Action of the New High-concentration Capsaicin 8% Patch. **Br J Anaesth.**;107(4):490-502 2011.

ANDERSSON, U., TRACEY, K.J. Neural reflexes in inflammation and immunity. **The Journal of experimental medicine** 209(6):1057-1068, 2012.

ANTOSOVA M, PLEVKOVA J, STRAPKOVA A, BUDAY T. 2012. Nitric oxide - Important messenger in human body. **Open J Mol Integr Physiol** 2: 98-106, 2012.

AZA-GONZALEZ C, NUNEZ-PALENIUS H.G, OCHOA-ALEJO N. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). **Plant Cell Rep** 30:695–706, 2011.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation** 118(2): 413-420, 2008.

BASBAUM AI, BAUTISTA DM, SCHERRER G, JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell** 39(2):267-84, 2009.

BELLIK, Y., BOUKRAA, L. ,ALZHRANI, H.A., BAKHOTMAH, B. A., ABDELLAH, F., HAMMOUDI, S.M., IGUER-OUADA, M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**18,322–353, 2013.

BRADLEY JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology** 214(2):149-60, 2008.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology** 78,206–209. 1982.

CASTRO-CONCHA LA, TUYUB-CHE J, MOO-MUKUL A, VAZQUEZ-FLOTA FA, MIRANDA-HAM ML. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero pepper) at different stages of ripening. **Scientific World Journal.** 11, 2014:809073, 2014.

CHOVATIYA R, MEDZHITOV R. Stress Inflammation and Defense of Homeostasis. **Molecular Cell** 54: 281-288, 2014.

CHUN JM, NHO KJ, KIM HS, LEE AY, MOON BC, KIM HK. An ethyl acetate fraction derived from *Houttuynia cordata* extract inhibits the production of inflammatory markers by suppressing NF- κ B and MAPK activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **BMC Complement Altern Med**.14:234, 2014.

CIRINO G, DISTRUTTI E, WALLACE JL. "Nitric oxide and inflammation Inflamm. **Allergy Drug Targets** 5(2): 115-119, 2006.

COSTA G, FRANCISCO V, LOPES MC, CRUZ, MT, BATISTA, MT. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. **Current Medicinal Chemistry** 19:2876–2900. 2012.

COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience** 32: 1-32, 2009.

COUTAUX A, ADAM F, WILLER J.C, LE BARS D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine** 72: 359–37, 2005.

CURY Y, PICOLO G, GUTIERREZ VP, FERREIRA SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, 25(3):243-54, 2011.

CZESCHIKA J.C, HAGENACKERA T, SCHÄFERSB M, BÜSSELBERG D. TNF- α differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. **Neuroscience Letters** 434 (3):293–298, 2008.

DINARELLO C.A. Historical Review of Cytokines. **European journal of immunology** 37(Suppl 1): S34–S45, 2007.

DINARELLO CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**. 140(6):935-50, 2010.

DRAYTON, D. L., LIAO, L., MOUNZER, R.H., RUDDLE, N.H."Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." **Nature Immunology** (4): 344-353, 2006.

DUGOFF EH, CANUDAS-ROMO V, BUTTORFF C, LEFF B, ANDERSON GF. Multiple chronic conditions and life expectancy: a life table analysis. **Medical Care** 52(8):688-694, 2014.

EMBRAPA HOTALIÇAS. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#pimenta>>. Acessado em 25 de fevereiro de 2015.

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

GAUTAM R, JACHAK SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews** 29:767–820, 2009.

GIUFFRIDA D, DUGO P, TORRE G, BIGNARDI C, CAVAZZA A, CORRADINI C, DUGO G. Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry** 4: 794–802, 2013.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.** 126 (1):131-8, 1982.

GRISHAM MB, JOHNSON GG, LANCASTER JR Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol** 268:237–46, 1996.

GUAY J, BATEMAN K, GORDON R, MANCINI J, RIENDEAU D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biological Chemistry** 279, 24866–24872, 2004.

GUYTON AC, HALL JE. **Tratado de fisiologia médica.** 12^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

HARVEY A.L, EDRADA-EBEL R. QUINN R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery** 14, 111–129, 2015.

HARVEY A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today** 13: 894-901., 2008.

HERNÁNDEZ-ORTEGA M, ORTIZ-MORENO A, HERNÁNDEZ-NAVARRO MD, CHAMORRO-CEVALLOS G, DORANTES-ALVAREZ L, NECOECHEA-MONDRAGÓN H. Antioxidant Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L.). **J Biomed Biotechnol** 2012: 1-10, 2012.

HESS A, AXMANN R, RECH J, FINZEL S, HEINDL C, KREITZ S, SERGEEVA M, SAAKE M, GARCIA M, KOLLIAS G, STRAUB RH, SPORNS O, DOERFLER A, BRUNE K, SCHETT G. Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 108(9):3731-6, 2011.

HESSLINGER C, STRUB A, BOER R, ULRICH WR, LEHNER MD, BRAUN C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. **Biochem Soc Trans.** 2009.

HUANG N, RIZSHSKY L, HAUCK C, NIKOLAU BJ, MURPHY PA, Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse. **Phytochemistry** 72(16): 2015–2023, 2011.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30(1):103-14, 1987.

HUR, S.J., KANG, S.H., JUNG, H.S., KIMB, S.C., JEON, H.S., KIM, I.H., LEE, J.D. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. **Nutrition Research** 32,801–816,2012.

IMMKE D.C, GAVVA N.R. The TRPV1 receptor and nociception. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 17, 582–591, 2006.

JANAKIRAM NB, RAO CV. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem.* 2012, (17):2193-204.

JOLAYEMI AT, OJEWOLE JA. Analgesic effects of *Capsicum frutescens* Linn. (Solanaceae) fruit aqueous extract in mice. **Glo Adv Res J Med Med Sci** 3: 325-330, 2014.

JOLAYEMI AT, OJEWOLE JA. Comparative anti-inflammatory properties of Capsaicin and ethyl-aAcetate extract of *Capsicum frutescens* Linn [Solanaceae] in rats. **Afr Health Sci.** 13: 357-361, 2013.

JONES E, ADCOCK IM, AHMED BY, PUNCHARD NA. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages. **J Inflamm** (Lond) 4:23, 2007.

JOO JI, KIM DH, CHOI JW, YUN JW. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. **J Proteome Res.** 9(6):2977-87, 2010.

JULIUS D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** (29):355-384, 2013.

KAPPEL, V.D., COSTA, G.M., SCOLA, G., SILVA, F.A., LANDELL, M.F., VALENTE, P., SOUZA, D.G., VANZ, D.C., REGINATTO, F.H., MOREIRA, J.C. Phenolic content and antioxidante and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. **Journal of Medicinal Food** 11, 267–274. 2008.

KENNEDY WR, VANHOVE GF, LU SP, TOBIAS J, BLEY KR, WALK D, WENDELSCHAFER-CRABB G, SIMONE DA, AND SELIM MM. A randomized, controlled, open-label study of the long-term effects of NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, on epidermal nerve fiber density and sensory function in healthy volunteers. **J Pain** 11:579–587, 2010.

KIM Y, LEE J. Anti-Inflammatory Activity of Capsaicin and Dihydrocapsaicin through Heme Oxygenase-1 Induction in Raw264.7 Macrophages.. **Journal of Food Biochemistry** 38(4):381–387, 2014.

KNOTKOVA H, PAPPAGALLO M, SZALLASI A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) Therapy for Pain Relief: Farewell or Revival? **Clin J Pain** 24:142–154, 2008.

KOEBERLE, A., WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discov Today** 19 (12): 1871–1882, 2014.

KOSTER R, ANDERSON M, DEBEER EI. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc** 18:412–8. 1959.

LAWRENCE T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6:1-10, 2009.

LIU, Y., NAIR, M.G. Capsaicinoids in the hottest pepper Bhut Jolokia and its antioxidant and antiinflammatory activities. **Natural Product Communications** 5, 91–94, 2010.

LORAM, L.C., FULLER, A., FICK, L.G., CARTMELL, T., POOLE, S., MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Journal of Pain** 8, 127–136, 2007.

SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H., INOKI, R. "Modified formalin test: characteristic biphasic pain response," **Pain**, 38 (3): 347–352, 1989.

MCGARAUGHTY S, CHU KL, BITNER RS, MARTINO B, EL KOUHEN R, HAN P, NIKKEL AL, BURGARD EC, FALTYNEK CR, JARVIS MF. Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. **J Neurophysiol** 90:2702–2710, 2003.

MEDEIROS R, PREDIGER RD, PASSOS GF, PANDOLFO P, DUARTE FS, FRANCO JL, DAFRE AL, DI GIUNTA G, FIGUEIREDO CP, TAKAHASHI RN, CAMPOS MM, CALIXTO JB. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. **J Neurosci** 20: 5394-53404, 2007.

MEDZHITOV R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell.** 140(6):771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. "Origin and physiological roles of inflammation." **Nature** 454 (7203): 428-435, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acessado em 26 de fevereiro de 2015.

MIN-SANG YOOA, JI-SUN SHINA, HYE-EUN CHOIA, YOUNG-WUK CHOD, MYUN-HO BANGF, NAM-IN BAEKF, KYUNG-TAE LEE. Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor-kB and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 macrophages. **Food Chemistry** 135(3): 967–975, 2012.

MIZUMURA K, SUGIURA T, KATANOSAKA K, BANIK RK, KOZAKI Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? **Exp Brain Res.** 196(1):53-65, 2009.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 65 (1-2):55-63. 1983.

MUELLER, M., HOBIGER, S., JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry** 122, 987–996. 2010.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology** 3(323): 1-2, 2012.

NATHAN, C. "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol** 6(3): 173-182, 2006.

NAVEEN CHHABRA, M. L. ASERI, VANDANA GOYAL, SANJAY SANKHLA. Capsaicin: A promising therapy – A critical reappraisal. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases** 2(1); 2012.

NAVRATILOVA E, PORRECA F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience** 17(10):1304-1312, 2014.

NECAS J, BARTOSIKOVA L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, 58 (4): 187–205, 2013.

O'Neill, J., Christina Brock, Anne Estrup Olesen, Trine Andresen, Matias Nilsson, and Anthony H. Dickenson. Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. **Pharmacol Rev** 64:939–971, 2012

OKIN D, MEDZHITOV R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology** 22: 733-740, 2012.

OLIVEIRA R.G, NETO MAHON C.P, MARSON ASCÊNCIO P.G.M, ASCÊNCIO S.D, BALOGUN S.O, OLIVEIRA MARTINS D.T. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of Ethnopharmacology** 155 387–395, 2014.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Conquering suffering, enriching humanity: Life expectancy, health expectancy. Disponível em <http://www.who.int/whr/1997/media_centre/executive_summary1/en/>. Acessado em 26 de fevereiro de 2015.

OSSIPOV MH, DUSSOR GO, PORRECA F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation** 120(11):3779-3787, 2010.

PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev** 1: 315-424, 2007.

PATRIGNANI P, PATRONO C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851(4):422–432, 2014.

PAUTZ A, ART J, HAHN S, NOWAG S, VOSS C, KLEINERT H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide** 23: 75-93, 2010.

POBER, J. S., SESSA W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation." **Nature Reviews Immunology** 7(10): 803-815, 2007.

POSADAS I, BUCCI M, ROVIEZZO F, ROSSI A, PARENTE L, SAUTEBIN L, CIRINO G: Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology** 142, 331–338, 2004.

REICHLING, D.B., GREEN, P.G., LEVINE, J.D. The fundamental unit of pain is the cell. **Pain** 54 Suppl 1:S2-S9, 2013.

RICCIOTTI, E., FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology** 5:986-1000, 2011.

RIEDEL R, MARRASSINI C, ANESINI C, GORZALCZANY S. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of *Urera aurantiaca*. **Phytother. Res.** 2014.

ROCHA, A.P.C., KRAYCHETE, D.C., LEMONICA, L., CARVALHO, L.R., BARROS, G.A.M., GARCIA, J.B.S., SAKATA, R.K., Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. **Brazilian Journal of Anesthesiology** 57, 94–105, 2007.

BORGES, R., MARCUS VINÍCIUS MARIANO NASCIMENTO, ADRYANO AUGUSTTO VALLADÃO DE CARVALHO, MARIZE CAMPOS VALADARES, JOSÉ REALINO DE PAULA, ELSON ALVES COSTA, LUIZ CARLOS DA CUNHA. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013: 1-9, 2013.

SANDKÜHLER J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiol Rev** 89: 707–758, 2009.

SCHAIBLE HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology** 177:3-28, 2007.

SEDDER L.M, MCDERMOTT M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future **Cytokine & Growth Factor Reviews** 25:453–472, 2014.

SERHAN C. N. "Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways." **Annual Review of Immunology** 25: 101-137, 2007.

SERHAN C. N, SAVILL, J. "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." **Nat Immunol** 6(12): 1191-1197, 2005.

SHAIKH P.Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences (IJPLS)** 2(11): 1247-1263, 2011.

SHARMA JN, AL-OMRAN A, PARVATHY SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology** 15: 252-259, 2007.

SHARMA S.K, VIJ A.S, MOHIT SHARMA. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. **European Journal of Pharmacology** 720, 55–62, 2013.

SHERWOOD ER, TOLIVER-KINSKY T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology** 18 (3): 385-405, 2004.

SIEBERT S, TSOUKAS A, ROBERTSON J, MCINNES I. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases. **Pharmacol Rev.** 67(2):280-309, 2015.

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

SINGH, S., JARRET, R., RUSSO, V., MAJETICH, G., SHIMKUS, J., BUSHWAY, R., PERKINS, B. Determination of capsinoids by HPLC-DAD in capsicum spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 57(9): 3452-3457, 2009.

SPILLER, F., ALVES, M.K., VIEIRA, S.M., CARVALHO, T.A., LEITE, C.E., LUNARDELLI, A., POLONI, J.A., CUNHA, F.Q., DE OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology** 60, 473–478, 2008.

STAROWICZ K, MAIONE S, CRISTINO L, PALAZZO E, MARABESE I, ROSSI F, DE NOVELLIS V, AND DI MARZO V. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **J Neurosci** 27:13739–13749, 2007.

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery** 27(12): 507-511, 2009.

SYAM S, BUSTAMAM A, ABDULLAH R, SUKARI M.A, HASHIM N.M, MOHAN S, LOOI C.Y, WONG W.F, YAHAYU M.A, ABDELWAHAB S.I. β Mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo. **Journal of Ethnopharmacology** 153; 435–445, 2014.

THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Disponível em <<http://www.iasp-pain.org/>>. Acessado em 14 de fevereiro de 2015.

TOUSOULIS D, KAMPOLI AM, TENTOLOURIS C, PAPAGEORGIOU N, STEFANADIS C. 2012. The role of nitric oxide on endothelial function. **Curr Vasc Pharmacol** 10: 4-18, 2012.

VADIVELU N, WHITNEY C.J, SINATRA R.S. **Acute Pain Management: Pain Pathways and Acute Pain Processing.** Cambridge University Press, 2009.

VERRI WA JR, CUNHA TM, PARADA CA, POOLE S, CUNHA FQ, FERREIRA SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther.** 1:116-38, 2006.

VÍTEČEK J, LOJEK A, VALACCHI G, KUBALA L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. **Mediators of Inflammation.** 2012: 1-22, 2012.

WAHYUNI Y, BALLESTER AR, SUDARMONOWATI E, BINO RJ, BOVY AG. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. **Phytochemistry** 72: 1358–1370, 2011.

WAHYUNI Y, BALLESTER AR, TIKUNOV Y, DE VOS RC, PELGROM KT, MAHARIJAYA A, SUDARMONOWATI E, BINO RJ, BOVY AG. Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. **Metabolomics** 1: 130-144, 2013.

WINK DA, HINES HB, CHENG RY, SWITZER CH, FLORES-SANTANA W, VITEK MP, RIDNOUR LA, COLTON CA. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **J Leukoc Biol.** (6):873-91, 2011.

YANG WS, JEONG D, YI YS, LEE BH, KIM TW, HTWE KM, KIM YD, YOON KD, HONG S, LEE WS, CHO JY. Myrsine seguinii ethanolic extract and its active component quercetin inhibit macrophage activation and peritonitis induced by LPS by targeting to Syk/Src/IRAK-1. **J Ethnopharmacol.** 151(3):1165-74, 2014.

YANG ZH, WANG XH, WANG HP, HU LQ, ZHENG XM, LI SW. Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. **Urology.** 75(3):735-41. 2009, 2010.

ZHEN J, LU H, WANG XQ, VAZIRI ND, ZHOU XJ. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. **Am J Hypertens.** (1):28-34, 2008.

ZIMMER AR, LEONARDI B, MIRON D, SCHAPOVAL E, OLIVEIRA JR, GOSMANN G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacol** 139 (1): 228-233, 2012.
