

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA BERGENINA  
PARA O CONTROLE DA DOR INFLAMATÓRIA:  
UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

CRISTIANE METZKER SANTANA DE OLIVEIRA

Salvador – Bahia

2010

Cristiane Metzker Santana De Oliveira

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA BERGENINA  
PARA O CONTROLE DA DOR INFLAMATÓRIA:  
UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Dra. Cristiane Flora Villarreal

Salvador - Bahia

2010

Cristiane Metzker Santana De Oliveira

# POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA BERGENINA PARA O CONTROLE DA DOR INFLAMATÓRIA: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

## BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Flora Villarreal – Univeridade Federal da Bahia**

---

**Prof. Dr. Ajax Mercedes Atta- Universidade Federal da Bahia**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Macambira – Fundação Oswaldo Cruz**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às minhas pedras preciosas, frutos do meu ventre, minhas duas princesas Letícia e Larissa que tem me proporcionado o inestimável de ser mãe.

Ao meu leal, amigo, companheiro, amor e marido, Luis Alberto; que em todos os momentos dessa árdua jornada esteve ao meu lado como apoio e auxílio.

Aos meus pais, Edna e Antônio que são meu exemplo de vida, minhas referências de princípios e valores e que de maneira inesgotável me ajudam e orientam com todo amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu Grandioso Deus, cujo nome é Jeová, por ter permitido que eu completasse essa etapa da minha vida e ter me proporcionado tamanha alegria. Por ter me dado forças nos momentos difíceis em que, nem mesmo eu sabia que poderia continuar; mas graças a sua benevolência e misericórdia, me agraciou com suas bençãos.

À minha orientadora, professora doutora Cristiane Flora Vilareal que com paciência, zelo, competência e maestria orientou-me e ajudou-me nessa jornada que por hora finda.

Aos meus pais, que com apoio singular me ajudaram e incentivaram a sempre buscar meus objetivos. Que me ensinaram a perseverar e continuar atingindo alvos, transformando sonhos em realidade.

À doutora Milena Botelho Pereira Soares por ter me aceitado no LETI.

À Fabiana Nonato pela ajuda, pela alegria e bom humor sempre demonstrada durante essa jornada. Não tenho palavras para agradecer. Obrigada por tudo!!

À Marlene Cerqueira pela ajuda nos experimentos finais sempre se preocupando com minha gravidez.

Aos meus colegas Vínicius Rocha e Gisele Leite pela enorme ajuda nos meus experimentos.

### **Citação do autor**

“Para tudo tenho força em virtude daquele que me confere poder.”

Filipenses 4:13. - Apóstolo Paulo.

## RESUMO

### POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA BERGENINA PARA O CONTROLE DA DOR INFLAMATÓRIA: UM ESTUDO PRÉ-CLÍNICO

Bergenina, um C-glicosídeo de ácido gálico que tem sido isolado em vários gêneros de plantas, exibe atividade imunomoduladora através do balanço da produção de citocinas Th1/Th2. Inibidores da produção de citocinas podem exibir atividade modificadora da doença, representando uma melhor estratégia terapêutica para o controle das doenças inflamatórias. Considerando o papel chave das citocinas durante a hiperalgesia inflamatória, o presente estudo foi elaborado para avaliar se a bergenina, extraída de *Cenostigma gardnerianum*, possui propriedades antinociceptivas em modelos de dor inflamatória e investigar possíveis mecanismos envolvidos com esses efeitos. O pré-tratamento agudo dos camundongos com bergenina (12.5-100 mg/kg IP) produziu inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Do mesmo modo, o tratamento com bergenina (50 e 100 mg/kg) inibiu ambas as fases do teste de formalina. Em adição, a administração de bergenina (50 e 100 mg/kg IP) inibiu a hiperalgesia mecânica, edema de pata e produção local de citocinas hiperalgênicas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) induzidos por Adjuvante Completo de Freund (CFA). Por outro lado, a produção local de IL-10, uma citocina antiinflamatória, não foi afetada pela bergenina (100 mg/kg IP). Descartando a contribuição de IL-10 para a antinocicepção da bergenina, sua administração produziu antinocicepção de similar padrão em camundongos selvagens e deficientes em IL-10. Em outra série de experimentos, demonstramos que camundongos tratados com bergenina (100 mg/kg IP) não mostraram nenhuma alteração do desempenho motor nos testes de rota rod e campo aberto. No ensaio de citotoxicidade *in vitro*, bergenina a 100  $\mu$ g/ml não apresentou citotoxicidade. Do mesmo modo, a administração sub-crônica de bergenina não causa toxicidade sistêmica detectável, como evidenciada pela análise de padrões comportamentais, toxicidade gástrica, contagem de leucócitos e dosagens de uréia, creatinina, ALT e AST. Os resultados apresentados aqui demonstram que a bergenina tem consistentes propriedades antinociceptiva e antiinflamatória, atuando através da inibição da produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O presente estudo indica o potencial terapêutico da bergenina para o controle da dor inflamatória, entretanto, o preciso mecanismo pelo qual esta molécula exerce sua ação farmacológica está ainda sob investigação.

## ABSTRACT

Bergenin, a C-glucoside of 4-O-methylgallic acid that has been reported to occur naturally in several genera, exhibit immunomodulatory activity through balancing of Th1/Th2 cytokine production. Inhibitors of cytokine production can exhibit disease-modifying activities, representing an improved therapeutic strategy for the control of inflammatory diseases. Considering the key role of cytokines during the inflammatory hyperalgesia, the present study was undertaken to evaluate whether bergenin has antinociceptive properties in models of inflammatory pain and to investigate possible mechanisms involved with its effects. Acute pretreatment of mice with bergenin (12.5-100 mg/kg IP) produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced writhing in mouse. Furthermore, treatment with bergenin (50 and 100 mg/kg) inhibited both the early and late phases of formalin test. Another set of experiments showed that bergenin (50 and 100 mg/kg IP) inhibited the mechanical hyperalgesia, edema and paw production of hyperalgesic cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) induced by complete Freund's adjuvant (CFA). On the other hand, the local production of IL-10, a antiinflammatory cytokine, was not altered by bergenin (100 mg/kg IP). Disproving the contribution of IL-10 to the bergenin antinociception, the bergenin treatment produced a similar profile of antinociception in wild-type and IL-10-deficient mice. Bergenin (100 mg/kg IP)-treated mice did not show any motor performance alterations. On the cytotoxicity assay, bergenin at 100  $\mu$ g/ml did not present cytotoxicity. Moreover, the sub-chronic administration of bergenin did not cause any apparent systemic toxicity. The results present here demonstrate that bergenin has consistent antinociceptive and antiinflammatory properties, acting through the inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production. The present study supports the therapeutic potential of bergenin to control the inflammatory pain, however, the precise mechanisms through which bergenin exerts its action, are currently under investigation.

**Key words:** Bergenin, antinociception, inflammatory pain, cytokines, toxicity

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Estrutura molecular da bergenina  | 20 |
| <b>Figura 2</b>  | Camundongo Swiss  | 24 |
| <b>Figura 3</b>  | Teste de contorção  | 25 |
| <b>Figura 4</b>  | Filamentos de von Frey  | 27 |
| <b>Figura 5</b>  | Caixa acrílica transparente sobre espelho   | 28 |
| <b>Figura 6</b>  | Plestimógrafo   | 29 |
| <b>Figura 7</b>  | Aparelho de rota-rod  | 31 |
| <b>Figura 8</b>  | Efeitos da administração intraperitoneal de bergenina no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético  | 36 |
| <b>Figura 9</b>  | Efeitos da administração intraperitoneal de bergenina no teste da formalina   | 38 |
| <b>Figura 10</b> | Efeitos da administração intraperitoneal de bergenina na inflamação local induzida por Adjuvante Completo de Freund | 40 |
| <b>Figura 11</b> | Efeitos da bergenina na produção local de citocinas hiperalgésicas induzida por adjuvante completo de Freund        | 41 |
| <b>Figura 12</b> | Efeitos da bergenina nos níveis locais de IL-10 e na hiperalgesia inflamatória de animais deficientes em IL-10      | 43 |
| <b>Figura 13</b> | Efeitos da administração intraperitoneal de bergenina nos testes de rota rod (A) e campo aberto (B)                 | 45 |
| <b>Figura 14</b> | Análise histopatológica da mucosa gástrica de camundongos após a administração diária de bergenina                  | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 – Citotoxicidade da Bergenina                           | 46 |
| TABELA 2 – Efeitos gástricos do tratamento diário com bergenina  | 48 |
| TABELA 3 – Efeitos sistêmicos do tratamento diário com bergenina | 49 |

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|       |   |
|-------|---|
| ±     | Mais ou menos   |
| A.C   | Antes de Cristo   |
| AA    | Ácido Araquidônico  |
| AINES | Antiinflamatórios não esteroidais   |
| ALT   | Aspartato Alanina Transferase   |
| AMPc  | Adenosina Monofosfato Cíclico   |
| ANOVA | Análise de Variância  |
| AST   | Aspartato Aminotransferase  |
| ATP   | Adenosina Tri-fosfato (do inglês <i>Adenosine triphosphate</i> )  |
| CFA   | Adjuvante Completo de Freund (do inglês <i>Complete Freund's Adjuvant</i> )                                       |
| cm    | Centímetros   |
| COX   | Ciclooxigenase  |
| COX1  | Ciclooxigenase–1  |
| COX-2 | Ciclooxigenase–2  |
| CPqGM | Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz  |
| E.P.M | Erro Padrão da Média  |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )                                    |
| EUA   | Estados Unidos da América   |
| g     | Grama   |
| GABA  | Ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>gamma-Aminobutyric acid</i> )  |
| h     | Horas   |
| HUEFS | Herbário do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana                                  |
| IASP  | Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, <i>International Association of the Study of Pain</i> ) |
| IL-1β | Interleucina-1 beta   |
| Kg    | Kilograma   |

|               |  |
|---------------|--|
| mg            | Miligrama  |
| mg/Kg         | Miligrama por quilograma   |
| NGF           | Fator de Crescimento do Nervo  |
| NOS           | Óxido Nítrico Sintase (do inglês, <i>Nitric Oxide synthase</i> )                               |
| °C            | Grau centígrado  |
| PGE2          | Prostaglandina E2  |
| PGG2          | Prostaglandina G2  |
| PGH2          | Prostaglandina H2  |
| PMSF          | Fenil-metil-sulfonil Fluorida (do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )                |
| R&D           | Pesquisa e Desenvolvimento (do ingles <i>Research and Development</i> )                        |
| RNA           | Ácido ribonucléico (do inglês Ribonucleic Acid)  |
| s             | Segundos   |
| SC            | Via Subcutânea   |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral- alfa (do inglês, <i>tumor necrosis factor- <math>\alpha</math></i> ) |
| TTX-R         | Tetrodotoxina resistente (do inglês tetrodotoxin-resistant)                                    |
| UEFS          | Universidade Estadual de Feira de Santana  |
| $\alpha$      | Alfa   |
| $\beta$       | Beta   |
| $\gamma$      | Gama   |
| $\mu$ g       | Micrograma   |
| $\mu$ L       | Microlitro   |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1.0 - INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 1.1 - Dor: aspectos gerais.....   | 14 |
| 1.2 - Tipos de dor.....   | 16 |
| 1.3 – Controle farmacológico da dor inflamatória .....                            | 17 |
| 1.4 - Bergenina .....   | 19 |
| 2.0 - OBJETIVOS .....   | 22 |
| Objetivo Geral.....   | 22 |
| Objetivos Específicos .....   | 22 |
| 3.0 - MATERIAL E MÉTODOS .....  | 23 |
| 3.1 - Material Vegetal.....   | 23 |
| 3.3 - Animais.....  | 24 |
| 3.3 - Testes Nociceptivos.....  | 25 |
| 3.3.1 - Teste de contorções abdominais .....                                      | 25 |
| 3.3.2 - Teste da formalina .....  | 25 |
| 3.3.3 – Quantificação de limiar nociceptivo mecânico: filamentos de von Frey..    | 26 |
| 3.3.4 – Quantificação de edema de pata.....                                       | 28 |
| 3.3.5 – Dosagem de citocinas: ELISA.....  | 29 |
| 3.3.7 – Testes de função motora: rota rod e campo aberto .....                    | 30 |
| 3.3.8 - Avaliação da mucosa gástrica .....  | 32 |
| 3.3.9 – Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....                            | 32 |
| 3.3.11 – Drogas, reagentes e diluições.....                                       | 34 |
| 3.3.12 – Análise dos dados .....  | 34 |
| 4.0 – RESULTADOS .....  | 36 |
| 4.1 - Efeito antinociceptivo da bergenina no teste de contorções abdominais ..... | 36 |
| 4.2. Efeito antinociceptivo da bergenina no teste de formalina.....               | 37 |
| 4.3 - Efeitos da bergenina na inflamação local induzida por CFA.....              | 39 |
| 4.5 – Efeito da bergenina sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias .....   | 41 |
| 4.6 – Contribuição de IL-10 para a antinocicepção da bergenina.....               | 42 |
| 4.7. Efeito da bergenina no desempenho motor dos camundongos.....                 | 44 |
| 4.8- Citotoxicidade da bergenina .....  | 46 |
| 4.8- Toxicidade gástrica da bergenina .....                                       | 46 |
| 4.10 – Toxicidade sistêmica da administração diária de bergenina.....             | 48 |
| 5.0 - DISCUSSÃO .....   | 50 |
| 6.0 – CONCLUSÕES .....  | 55 |
| 7.0 – REFERÊNCIAS .....   | 56 |

## **1.0 - INTRODUÇÃO**

### ***1.1 - Dor: aspectos gerais***

A dor é uma das grandes preocupações de muitos povos desde a origem das primeiras civilizações até a sociedade contemporânea. Nos povos primitivos a dor era considerada como punição por deuses ou ataque de demônios e, portanto o alívio ficava sob a responsabilidade de sacerdotes e feiticeiros. Em 700 A.C as comunidades furavam o crânio para liberar os maus espíritos acreditando que estes poderiam causar a dor de cabeça (Teixeira e Osaka 2001). A dor foi considerada pelos indianos como o fruto das frustrações e tristezas humanas, e seu controle era obtido com orações e meditações. Com o avanço da ciência, o conceito de dor foi mudado, e em 1662 o filósofo Descartes sugere no livro “De Homine” que a dor é transmitida da pele ao cérebro por pequenos filamentos. Nessa época, quando os conhecimentos da neuroanatomia humana passam a identificar os componentes anatômicos e funcionais responsáveis pela transmissão da dor, esta passa a ser vista como uma modalidade sensorial. Hoje a dor é conceituada como uma experiência complexa que envolve não somente a tradução de estímulos ambientais nocivos, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (Julius and Basbaum 2001). De acordo com esse conceito atual a dor possui um caráter sensorial, mas também um emocional ou psicológico, evidenciando que as concepções antigas não estavam completamente equivocadas.

A via de condução do estímulo doloroso até o cérebro começa no nociceptor, que é a terminação nervosa livre do neurônio aferente primário. Estudos eletrofisiológicos têm, de fato, mostrado que os nociceptores podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas, mas não por estímulos não nocivos tais como toques ou aquecimentos leves (Julius and Basbaum 2001). Os nociceptores são excitados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, como os mediadores inflamatórios, que ativam os canais iônicos de forma direta ou indireta, gerando um potencial de ação. Existem dois tipos principais de fibras aferentes envolvidas na condução da dor, as fibras A delta e C que conduzem a dor primária e secundária, respectivamente. A dor da fibra A delta é chamada de dor rápida, sendo bem localizada e aguda, enquanto a dor de fibra C é mais difusa e lenta (Schaible and Richter 2004).

As fibras aferentes primárias ativam neurônios do corno dorsal da medula espinal, onde realizam sua primeira sinapse. Da medula espinal, axônios ascendentes, que formam os tratos de condução da dor, ativam diferentes regiões encefálicas envolvidas na transmissão e processamento da dor. De um modo geral, vias de condução rápida, são responsáveis pelo aspecto sensorial discriminativo, isto é, o estímulo nocivo é analisado pela localização, duração e intensidade (Schaible and Richter 2004). Um segundo componente da dor é o aspecto afetivo, isto é, a sensação não prazerosa do estímulo nocivo que causa aversão. Este componente é conduzido em vias multisinápticas, de condução mais lenta, que ativam núcleos em regiões como o sistema límbico, córtex cingular anterior, e córtex pré-frontal (Woolf 1983).

## **1.2 - Tipos de dor**

A dor pode ser classificada com base em diferentes aspectos. De um modo geral, podemos considerar que existem duas principais manifestações de dor. A dor fisiológica, que ocorre quando um estímulo nocivo é aplicado no tecido, tem uma função fisiológica nítida, ou seja, funciona como um sistema de alarme que protege o tecido contra a lesão, ativando reflexos de proteção (Basbaum and Woolf 1999; Schaible and Richter 2004). Uma condição diferente é a dor fisiopatológica, que pode ser aguda ou crônica. A dor aguda geralmente ocorre associada a dano tecidual e se manifesta como dor espontânea, hiperalgesia (resposta de dor aumentada a estímulo nocivo) e alodinia (resposta de dor a estímulo inócuo) (Schaible and Richter 2004). A dor aguda também tem função protetora, pois visa o reparo do tecido e desaparece quando ocorre a cura da lesão (Basbaum and Woolf 1999). Já a dor crônica é aquela que persiste mesmo tendo passado a fase de cura de uma lesão, e não tem aparentemente nenhuma função fisiológica ou protetora (Apkarian, Baliki et al. 2009). A dor crônica pode ser ou não associada à lesão tecidual, e seus mecanismos são ainda pobremente entendidos (Dray 1995).

A dor patológica pode também ser classificada em inflamatória ou neuropática com base na fisiopatologia e origem. Dor neuropática decorre da lesão ou disfunção dos nervos e é um dos mais prevalentes e debilitantes estados de dor crônica. A dor inflamatória é um sintoma comum de muitas doenças distintas, sendo caracterizada pela sensibilização dos neurônios aferentes primários (Cunha, Verri et al. 2005). A sensibilização dos nociceptores decorre da ação de diversos mediadores inflamatórios, como bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas (Mense e cols., 1996). Uma vez sensibilizados, os nociceptores passam a exibir aumento da

atividade espontânea, diminuição do limiar de ativação e aumento da responsividade à estimulação nociva (Dubner e Bennett, 1983). Estas modificações melhoram o desempenho das vias nociceptivas aumentando a sensibilidade para estímulos nocivos (hiperalgesia) e permitem que estímulos inócuos passem a ser interpretados como dolorosos (alodinia) (Julius e Basbaum, 2001). Além disso, o processo inflamatório é capaz de recrutar nociceptores silenciosos, não excitáveis em tecidos normais, mas que durante a inflamação são sensibilizados, tornando-se responsivos a estímulos posteriores (Schaible and Richter 2004).

Atualmente, tem sido aceito que as citocinas constituem um elo fundamental entre a injúria ou inflamação tecidual e a dor inflamatória (Ferreira et al., 1988; Faccioli et al., 1990; Dinarello, 2000). Citocinas pró- e anti-inflamatórias são mediadores cujo balanço modula a intensidade da hiperalgesia inflamatória (Verri-Júnior et al., 2006). O estímulo inflamatório estimula a liberação de citocinas hiperalgésicas, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que atuam diretamente nos nociceptores e também promovem a liberação dos mediadores finais - prostanóides e aminas simpáticas – responsáveis pela dor inflamatória (Cunha et al., 2005). Por outro lado, citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e IL-4, inibem a produção de citocinas hiperalgésicas e mediadores finais, reduzindo a hiperalgesia (Poole et al., 1995, Cunha et al., 1999).

### **1.3 – Controle farmacológico da dor inflamatória**

Geralmente a dor inflamatória ocorre de forma transitória. No entanto quando é associada a doenças crônicas de difícil tratamento, passa a ser uma fonte

de sofrimento para o indivíduo (Dubner e Ruda 1992). Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) são os medicamentos mais empregados no controle da dor inflamatória. Somente nos EUA foram emitidas 111 milhões de prescrições de AINEs no período de 1999 a 2000 (Lanas e Ferrandez 2006). Entretanto, seu uso está associado a efeitos indesejados graves como úlceras gastrointestinais e insuficiência renal, devido à inibição não seletiva das isoformas constitutiva (COX-1) e induzida (COX-2) das enzimas ciclooxigenase (COX) (Robert 1976; Peskar 1977; Tapiero, Ba e cols. 2002). Por outro lado, inibidores seletivos da COX-2, que apresentam menos toxicidade gástrica, tem sido associados a toxicidade cardiovascular e maior incidência de infarto do miocárdio (Dogné e cols., 2005). Em função dos efeitos indesejados, e da freqüente ineficácia dos medicamentos atualmente disponíveis, o adequado controle da dor inflamatória constitui ainda um desafio.

Em contraste aos AINEs, inibidores da produção de citocinas exibem atividade modificadora da doença em modelos animais de inflamação (Geiger et al. 1994), representando uma melhor estratégia terapêutica para o controle das doenças inflamatórias. De fato, terapias anti-TNF- $\alpha$  tem se mostrado efetivas no tratamento de uma série de doenças associadas à inflamação como uveíte, manifestações de pele da psoríase e artrite reumatóide (Smith et al., 2005; Tobin e Kirby, 2005; Moreland, 1999; Haraoui, 2005). Por outro lado, o custo desses medicamentos, que incluem infliximab, etanercept e adalimumab, limita muito a difusão de sua utilização clínica.

#### **1.4 - Bergenina**

A observação da natureza proporcionou ao homem elementos para combater a dor e as doenças: analisou o fato de os animais banharem-se com barro para proteger-se das picadas dos insetos, observou como os cachorros purgavam-se comendo plantas e raízes, observou o surgimento de estados de excitação ou sonolência ao ingerir determinadas frutas ou ervas (Rastogi and Rawat 2008). Indubitavelmente, os meios físicos e os remédios vegetais foram os primeiros instrumentos que o homem usou como analgésicos (Teixeira e Osaka 2001). Nessa lista incluem-se os opióides e os AINEs, ambos originalmente extraídos de plantas, e que ainda hoje estão entre as principais classes de medicamentos utilizados no controle da dor.

Atualmente, 80% da população dos países em desenvolvimento dependem de plantas medicinais para o cuidado com a saúde devido à falta de recursos financeiros (Calixto et. al. 2000). Ao longo dos anos o interesse na pesquisa de novos fármacos a partir de produtos naturais tem aumentado. Uma prova disso é que entre 1981 e 2002 61% das 877 novas moléculas introduzidas como drogas em todo o mundo têm origem em produtos naturais (Newman and Snader 2003). Atualmente, cerca de 30% de todos os medicamentos disponíveis são derivados de produtos naturais (Calixto, 2000).

A *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae) é uma planta popularmente conhecida como “canela-de-velho”, “caneleiro” e “catingueira”, e pode ser encontrada na região do cerrado e caatinga baianos. A bergenina, um C-glicosídeo de 4-O-metil ácido gálico, é o principal componente dessa espécie (Nighat Nazir, 2007). É composta por três anéis de seis membros: um anel aromático, um anel de glicopirranose e uma lactona. (Subha and Rawat 2006).

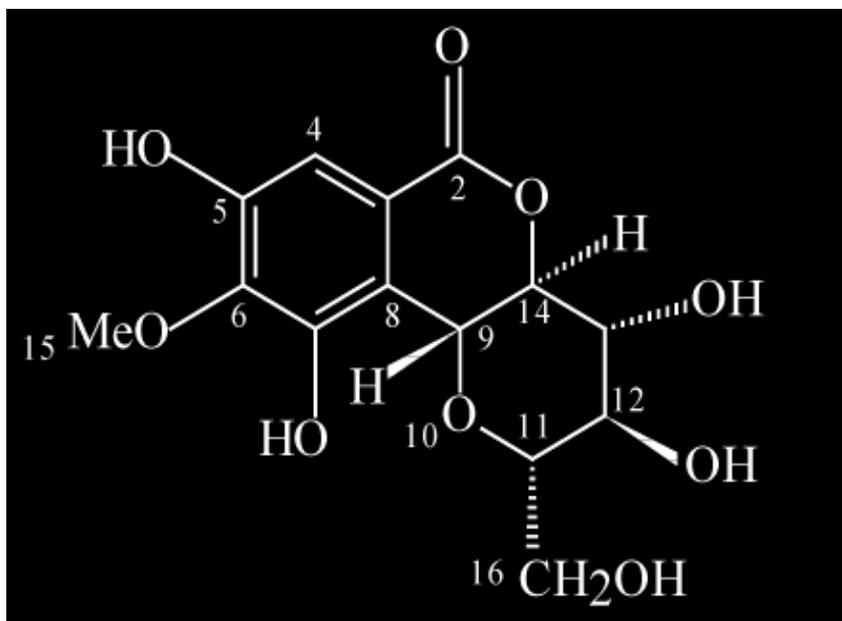


FIGURA 1 – Estrutura molecular da bergenina

Diversos estudos demonstraram que essa substância possui diferentes atividades farmacológicas, como antiinflamatória (Swarnalakshmi et al., 1984; Jachak et al., 2010), anti-tusígena (Piegen, 1980), hipolipidêmica (Jahromi et al., 1982), anti-HIV (Piacente et al., 1996), hepatoprotetora (Lim et al., 2000) e neuroprotetora (Takahashi et al., 2003). Recentemente foi constatado que a bergenina, isolada de rizomas de *Bergenina Stracheyi* (Saxifragaceae), possui potente atividade antiartrítica, relacionada com sua propriedade imunomoduladora, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias (Nighat Nazir, 2007). Considerando o papel chave das citocinas na dor inflamatória e a atividade imunomoduladora previamente descrita para a bergenina, o presente

trabalho investigará as propriedades antinociceptivas da bergenina em modelos de dor inflamatória, assim como possíveis mecanismos envolvidos com essa atividade. Adicionalmente investigaremos seu potencial para o desenvolvimento farmacológico investigando sua citotoxicidade, toxicidade sistêmica e possíveis efeitos indesejados, como comprometimento motor, sedação, lesão da mucosa gástrica, função hepática e renal.

## 2.0 - OBJETIVOS

### ***Objetivo Geral***

Realizar um estudo pré-clínico para investigar o potencial terapêutico e farmacológico da bergenina no controle da dor inflamatória.

### ***Objetivos Específicos***

- Avaliar se a bergenina possui atividade antinociceptiva em modelos de dor inflamatória;
- Caracterizar farmacologicamente a propriedade antinociceptiva da bergenina
- Investigar possíveis mecanismos envolvidos com as propriedades farmacológicas da bergenina;
- Investigar a citotoxicidade da bergenina;
- Investigar a toxicidade renal e hepática associadas à administração diária de bergenina;
- Analisar a ocorrência de efeitos indesejados, como comprometimento motor, sedação e lesão da mucosa gástrica, associada à administração diária de bergenina.

### **3.0 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - *Material Vegetal***

*Cenostigma gardnerianum* Tul. foi coletada no município de Casa Nova, Bahia, em Agosto de 2006, e recebeu identificação botânica pelo Dr. Luciano Paganucci de Queiróz. Após identificação, uma exsicata foi depositada no Herbário do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o número HUEFS 78.424.

#### **3.2. *Extração e Isolamento***

Os procedimentos de extração e purificação da bergenina a partir de *Cenostigma gardnerianum* Tul foram realizados no Laboratório de extração do Instituto de Química - UFBA, coordenado pelo Dr. Jorge Maurício David, parceiro deste projeto.

As cascas do caule (1200 g) foram extraídas com MeOH (3x 10 L). Após a filtração o solvente foi removido e o resíduo foi particionado com CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (6:4). O metanol da fase hidroalcoólica foi removido e as fases aquosas foram particionadas com EtOAc fornecidas da fase EtOAc.

Durante a concentração da fase EtOAc da casca do caule (30.70 g), um sólido cristalino foi precipitado e após a separação por filtração a bergenina pura (896 mg) foi obtida por recristalização com metanol. A estrutura química foi

determinada por análises espectroscópicas e comparada com a literatura de referência. A pureza química da bergenina (mais de 98%) foi determinada por HPLC.

### **3.3 - Animais**

As espécies utilizadas foram os camundongos da linhagem Swiss machos (Figura 2) pesando de 25-30 gramas, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ/BA. Camundongos C57Bl/6 selvagens (WT) ou deficientes em IL-10 (KO) foram também utilizados. Os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar, durante todo o período experimental, sob condições-padrão com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Em todos os experimentos foi respeitado protocolo estabelecido pela *International Association for the Study of Pain* - IASP para uso de animais de laboratório (Zimmermann, 1983). Os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM (protocolo L-IGM-012/09) antes do início do trabalho com os animais.



Figura 2 – Camundongo Swiss

### **3.3 - Testes Nociceptivos**

#### **3.3.1 - Teste de contorções abdominais**

Os animais foram colocados em funis de vidro individuais de 23 cm de diâmetro 30 minutos antes do experimento para ambientação. Ácido acético 0,8% (0,1 ml / 10 g de peso) foi injetado na cavidade peritoneal dos camundongos, que foram em seguida realocados nos funis para observação (Figura 3). A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem do número de contorções abdominais exibidas durante os 30 minutos seguintes à injeção do estímulo nociceptivo (Collier, Dinneen et al. 1968).



Figura 3 – Teste de contorção

#### **3.3.2 - Teste da formalina**

Os animais foram colocados em funis de vidros 30 minutos antes do experimento para ambientação. Em seguida foram removidos para a administração intraplantar de 25 µL de formalina 2% (diluição 1:100 da solução estoque de formalina, 37% de formaldeído em salina 0,9 %). Posteriormente foram realocados nos funis para observação. O escore de nocicepção foi determinado pela contagem do tempo em que o animal passou lambendo a pata injetada durante um período de 60 minutos (Dubuisson and Dennis 1977). O comportamento observado ocorreu de maneira bifásica, sendo a primeira fase (neurogênica) correspondente ao período de 0 - 10 minutos e a segunda fase (inflamatória) de 10 a 60 minutos.

### **2.3.3 - Modelo de inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund**

Os camundongos foram levemente anestesiados com Halotano e receberam injeção subcutânea de Adjuvante Completo de Freund (CFA; 20 µl, 1 mg/ml) na região plantar da pata direita (Kassuya et al., 2003). A hiperalgesia mecânica, edema de pata e produção local de citocinas foram avaliados com von Frey filamentos, pletismômetro e ELISA, como descrito abaixo.

### **3.3.3 – Quantificação de limiar nociceptivo mecânico: filamentos de von Frey**

Nesse estudo o limiar de resposta a estímulo mecânico foi avaliado com filamentos de von Frey (Figura 4). Estes filamentos consistem de segmentos de fio de nylon, cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo

fabricante (Stoelting, EUA). Os camundongos foram colocados em caixa de acrílico transparentes, elevadas sobre um espelho (Figura 5). O fundo da caixa consiste de uma tela de arame galvanizado, que permite acesso à superfície plantar da pata. Os animais permaneceram na caixa trinta minutos antes dos testes para a ambientação. No momento do teste a pata do camundongo é tocada pelo filamento e registra-se o filamento mais fino que tenha elicitado resposta positiva, ou seja, a sacudida ou retirada brusca da pata.



Figura 4 – Filamentos de Von Frey



Figura 5 – Caixa acrílica transparente sobre espelho

#### 3.3.4 – Quantificação de edema de pata

A quantificação do edema de pata foi realizada em pletismômetro (Ugo Basile, Comerio Italy). O volume da pata foi medido com o pletismômetro antes ( $V_b$ , basal) e após ( $V_f$ ) a injeção de CFA (Winter, Risley et al. 1962). A variação do volume foi avaliada determinada subtraindo-se o valor obtido do valor de volume da pata no tempo zero, ou seja, antes da administração do estímulo inflamatório.



Figura 6 – Plestimógrafo. Fonte: Retirado de <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-1517-Pletism%C3%83%C2%B4metro-de-Pata-para-Ratos-ou-Camundongos---Plethysmometer-Paw>

### 3.3.5 – Dosagem de citocinas: ELISA

Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nas amostras foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche. Os camundongos foram sacrificados duas horas após a administração intraplantar de CFA (20 $\mu$ L), e foi retirada a pele da pata posterior traseira. Em seguida o material foi pesado e, para cada 10 mg de tecido foram adicionados 100  $\mu$ L do tampão de extração de citocinas (0,4M de NaCl, 0,05% tween20, 0,5% de BSA, 0,1mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20KI aprotinina diluídos em PBS 1X). O material foi imediatamente

macerado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C para posterior quantificação de citocinas. Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nas amostras foram determinados com kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para cada citocina. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

### **3.3.7 – Testes de função motora: rota rod e campo aberto**

A possível interferência da bergenina com a capacidade motora e produção de déficits neurológicos nos animais foram avaliados pelo desempenho no aparelho de rota rod e teste de campo aberto. O aparelho rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) é constituído de uma barra horizontal rugosa de 3 cm de diâmetro localizada a 25 cm de altura, subdividido em cinco compartimentos e que gira em velocidade constante (Figura 7). Para manter-se no cilindro o animal necessita locomover-se, sendo a capacidade alterada de permanência no aparelho indicativo de prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. Para a realização do teste, os animais passaram por três treinos para habituação e aprendizado antes do dia do experimento, nos quais eles permaneceram por pelo menos 2 minutos no rota-rod a 6 rpm (Egashira, Tanoue et al. 2004). No dia do experimento, os animais foram colocados no rota-rod a 6 rpm e foi anotado o tempo de permanência na barra. O diazepam, um depressor do sistema nervoso central, diminuiu significativamente o tempo de permanência dos animais no rota-rod, e foi

usado como parâmetro de comparação (Kuribara and cols., 1977). Os resultados são expressos pela média de tempo em segundos (s) em que os animais permaneceram no aparelho.

O teste do campo aberto avalia respostas comportamentais como atividade locomotora, hiperatividade e comportamento exploratório. O aparato de acrílico opaco mede 50 cm X 60 cm X 40 cm, com piso demarcado em 12 quadrados. No momento do teste, o animal foi colocado em um dos cantos do aparato e foi registrado o número de vezes em que ele cruza os quadrados com as quatro patas durante 5 minutos.

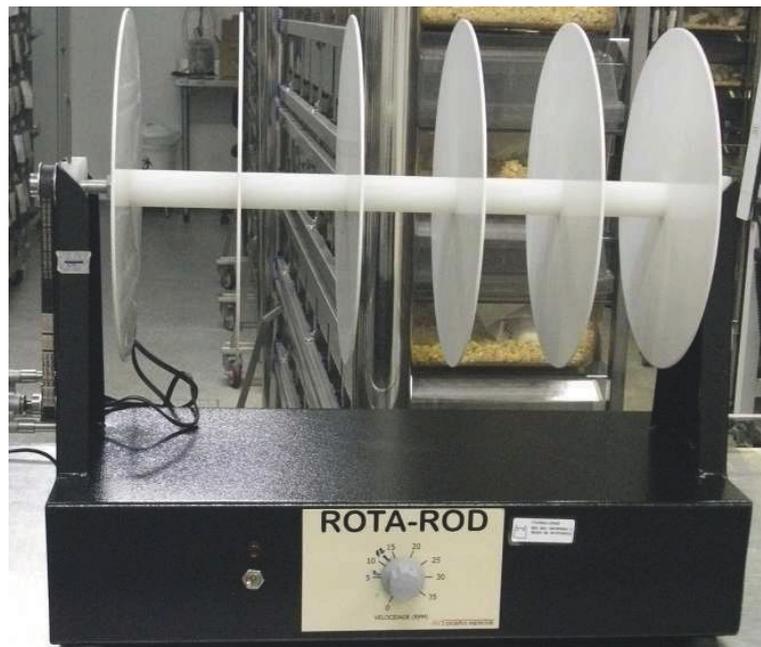


Figura 7 – Aparelho de rota-rod.

### **3.3.8 - Avaliação da mucosa gástrica**

A fim de avaliar possíveis efeitos gástricos da administração diária da bergenina, a análise histopatológica do estômago foi realizada. Os animais foram pesados diariamente e injetados com uma dose única de bergenina (50 e 100 mg / kg / IP) ou o veículo para 7 dias consecutivos. No final do tratamento, os estômagos foram retirados e abertos pela grande curvatura, lavados com solução salina, fixados em formol a 10%, lavados, desidratados e embebidos em parafina. Os blocos de tecido foram seccionados na espessura de 3  $\mu\text{m}$  (Criostato CM 1800; Leica, Nussloch, Alemanha), corados com hematoxilina-eosina e observados por microscópio (40  $\times$ ) para analisar as alterações morfológicas, infiltrado inflamatório, edema, perda de células epiteliais e necrose. As alterações histopatológicas foram avaliadas por meio da seguinte pontuação: 0, ausência; 1, discreto, 2, moderado, 3, de moderada a intensa, 4, intenso (Laine e Weinstein, 1988). Para cada estômago, 10 campos (40  $\times$ ) foram analisados por corte e o resultado foi expresso como média  $\pm$  SEM. As análises morfológicas foram feitas sem saber qual grupo experimental pertencia cada camundongo.

### **3.3.9 – Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

A citotoxicidade (CL50) da bergenina foi determinada utilizando camundongos BALB/c esplenócitos ( $5 \times 10^6$  células / poço) cultivados em placa de 96 poços em Medium Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e gentamicina (50  $\mu\text{g}$  / ml). A Bergenina foi avaliada 1, 10

e 100 µg / ml, em triplicata. Um controle positivo foi feito com células tratadas com solução de saponina a 1%. As culturas foram incubadas na presença de <sup>3</sup>H-timidina (1 µCi / poço), durante 24 horas a 37 ° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o conteúdo da placa foi colhido para determinar a incorporação de 3H-timidina usando um contador de radiação beta (β-matriz de 9600, Packard, Meriden, CT). A viabilidade das células foi determinado por meio da incorporação de timidina e a citotoxicidade foi calculada em relação às culturas não tratadas.

### **3.3.10. Avaliação dos efeitos sistêmicos da bergenia**

Os sinais de toxicidade, mortalidade e comportamento geral, bem como leucograma e parâmetros bioquímicos do sangue (concentração de creatinina, uréia, alanina aminotransferase / AST e aspartato aminotransferase / ALT) foram avaliados após o tratamento sub-crônico com bergenia.

Os animais foram pesados diariamente e injetados com uma dose única de bergenia (50 e 100 mg / kg / IP) ou o veículo para 7 dias consecutivos. No final do tratamento, as amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital de camundongos, sob o efeito de anestesia. As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de soro obtido após centrifugação do sangue total sem anticoagulante, a 2500 rpm por 15 min. Kits de diagnóstico espectrofotômetro padronizado por LABTEST® foram utilizados na determinação espectrofotométrica da concentração de uréia, AST, ALT e creatinina. Para a determinação do leucograma, uma alíquota de sangue por animal foi colocado em EDTA e as contagens de leucócitos foram realizadas utilizando um contador de células (Advia ® 60 Hematologia System; Bayer, Tarrytown, EUA).

### 3.3.11 – Drogas, reagentes e diluições

- PBS (Sigma/ St. Louis, MO, EUA): Tampão fosfato salino
- Tween 20 (Sigma/ St. Louis, MO, EUA): Reagente
- Flúorefenilmetilsulfonil (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- Cloreto de benzamethonium (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- EDTA (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- Aproptinin A (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- Eagle's Modified Dulbecco (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (Sigma/ St. Louis, MO, EUA)
- Diazepam (Roche, Suíça): agonista de receptores GABA.
- Indometacina (Prodome, Campinas, Brasil): dissolvida em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 mais salina.
- Dexametasona (Sigma/RBI, EUA): foi dissolvido em etanol (10% em solução fisiológica).
- Adjuvante completo de Freund (Sigma/RBI, EUA): estímulo inflamatório.
- Hematoxilina-Eosina (Vetec, Brasil): corante
- Bergenina foi dissolvido em DMSO 2% com soro fisiológico. Previamente isolada no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. A pureza química da bergenina (mais que 98%) foi determinada por GC/HPLC.

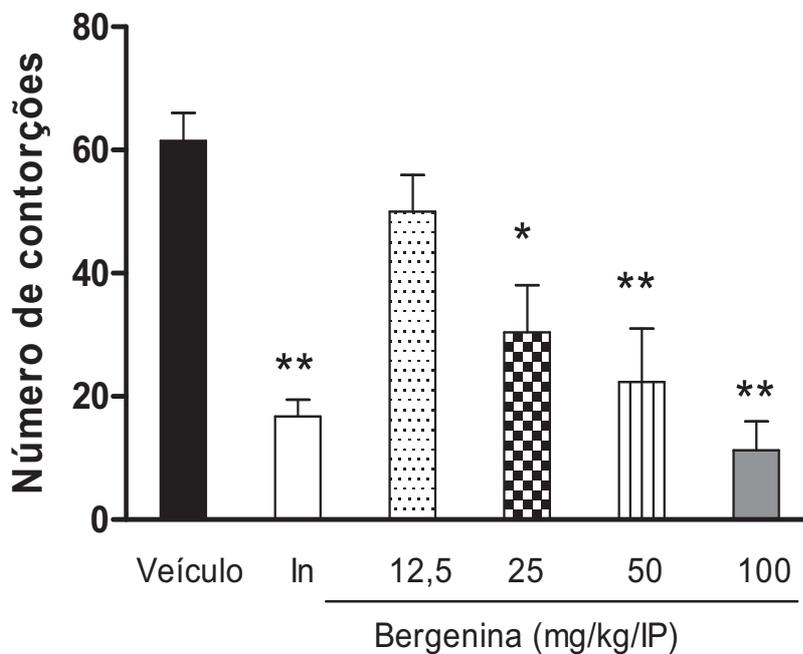
### 3.3.12 – Análise dos dados

Nos experimentos comportamentais os resultados foram representados como média  $\pm$ EPM de 6 animais por grupo. Dados do teste de von Frey filamentos foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e diferenças em cada ponto analisadas por Mann-Whitney. Nos demais ensaios os resultados foram analisados por ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey ou two-way seguido pelo teste de bonferroni, de acordo com a adequação. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

## 4.0 – RESULTADOS

### 4.1 - Efeito antinociceptivo da bergenina no teste de contorções abdominais

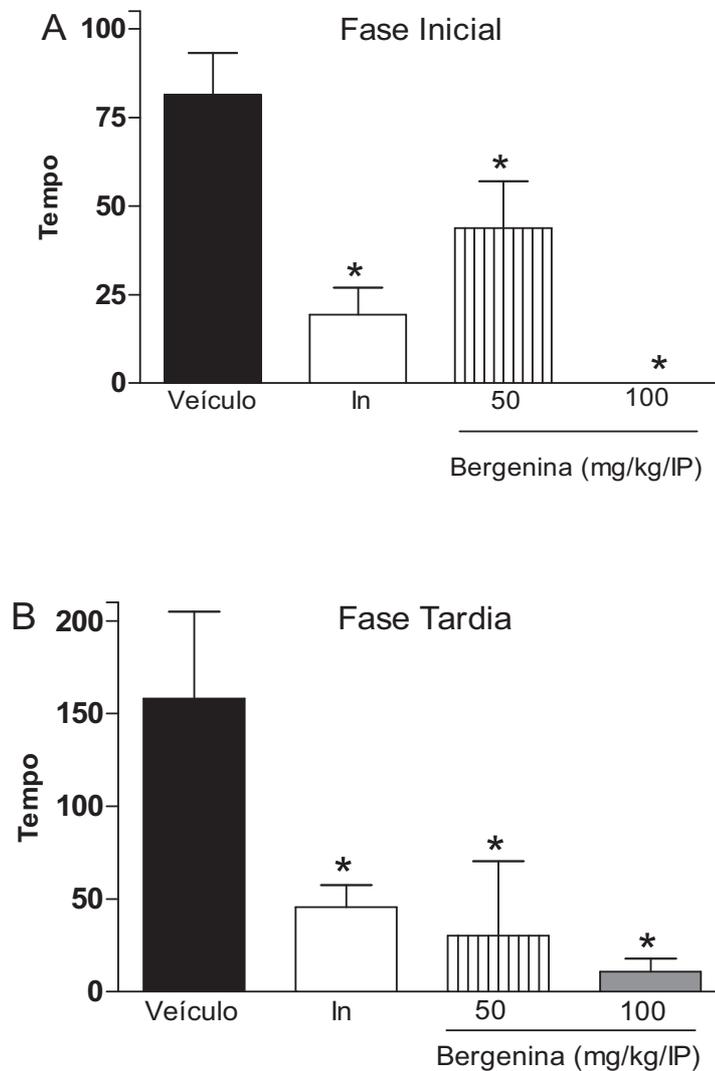
A atividade antinociceptiva da bergenina foi inicialmente avaliada no teste da contorções abdominais em camundongos. Foram administradas quatro doses de bergenina (12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de ácido acético. As dose de 25, 50 e 100 mg/Kg produziram uma inibição significativa e dose-dependente do número de contorções induzidas pelo ácido acético nos camundongos (Figura 8). A administração da indometacina (10 mg/kg), utilizada como controle positivo também reduziu o número de contorções induzidas pelo ácido acético.



**Figura 8.** Efeitos da administração intraperitoneal da bergenina em ácido acético, contorções induzidas em camundongos. Os camundongos foram tratados com bergenina (12,5 - 100 mg / kg IP) ou veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes do ácido acético 0,8% (injetado no tempo zero). Indometacina (em, 10 mg / kg IP) foi o medicamento de referência. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM; n = 6 animais por grupo. Significativamente diferente do grupo controle (P <0,01), \*\* significativamente diferente do grupo controle (P <0,001), conforme determinado pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

#### ***4.2. Efeito antinociceptivo da bergenina no teste de formalina***

A injeção de formalina promoveu, como previsto, um comportamento nociceptivo bifásico. O tratamento com a bergenina (50 e 100 mg/Kg) 30 minutos antes da administração da formalina inibiu tanto a primeira (Fig. 9A) quanto a segunda (Fig. 9B) fase da formalina. A indometacina (5 mg/Kg), usada como padrão ouro, também causou um efeito antinociceptivo nas duas fases.

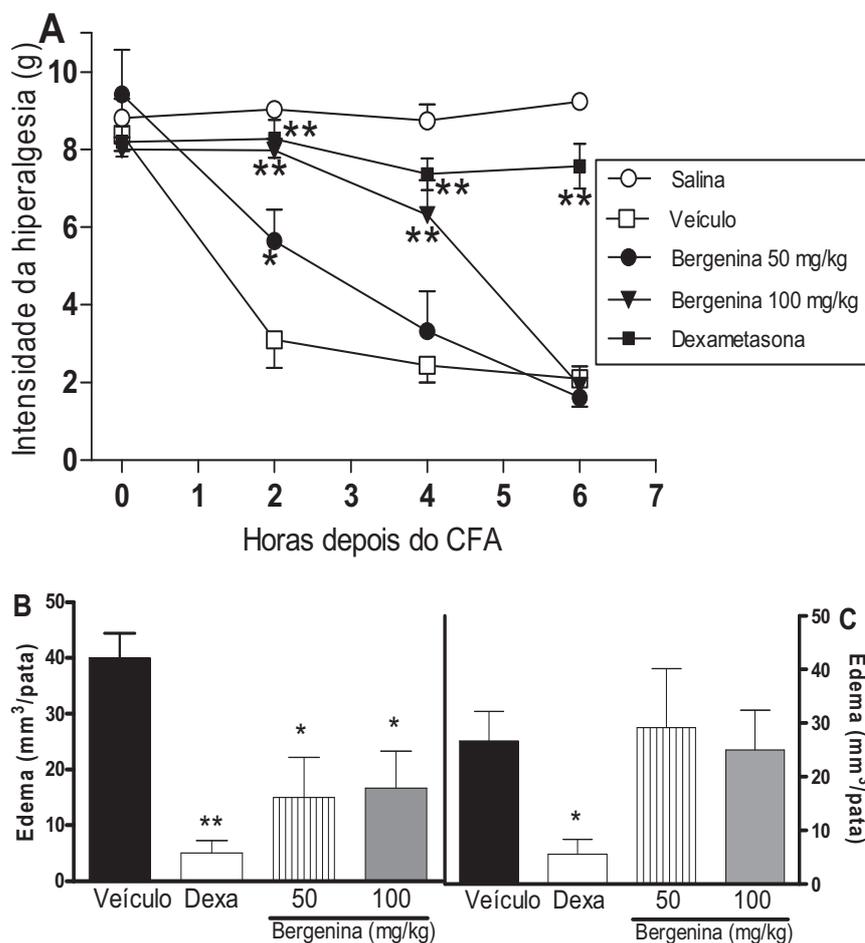


**Figura 9.** Efeitos do tratamento bergenia sobre a dor inflamatória induzida pela formalina. Figuras A e B representam os efeitos da bergenia nas fases precoce e tardia da nociceção induzida por formalina em camundongos, respectivamente. Os camundongos foram tratados com bergenia (50 e 100 mg / kg) ou veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle) por via intraperitoneal 40 minutos antes da formalina (injetado no tempo zero). Indometacina (Em, 10 mg / kg IP) foi o

medicamento de referência. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM; n = 6 animais por grupo. \* Significativamente diferente do grupo controle (P <0,001), conforme determinado pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

#### **4.3 - Efeitos da bergenia na inflamação local induzida por CFA**

A administração da bergenia (50 e 100 mg/Kg) 30 minutos da injeção do CFA reduziu a hiperalgesia mecânica 2 e 4 h, mas não 6 h, após o estímulo (Fig. 11A). De modo similar, a bergenia reduziu significativamente o edema da pata 2 e 4 h, mas não 6 h, após o estímulo (Fig. 11B e 11C). A dexametasona (0,5 mg/kg), utilizada como controle positivo, reduziu significativamente a hiperalgesia e o edema da pata 2, 4 e 6 h, após o estímulo.

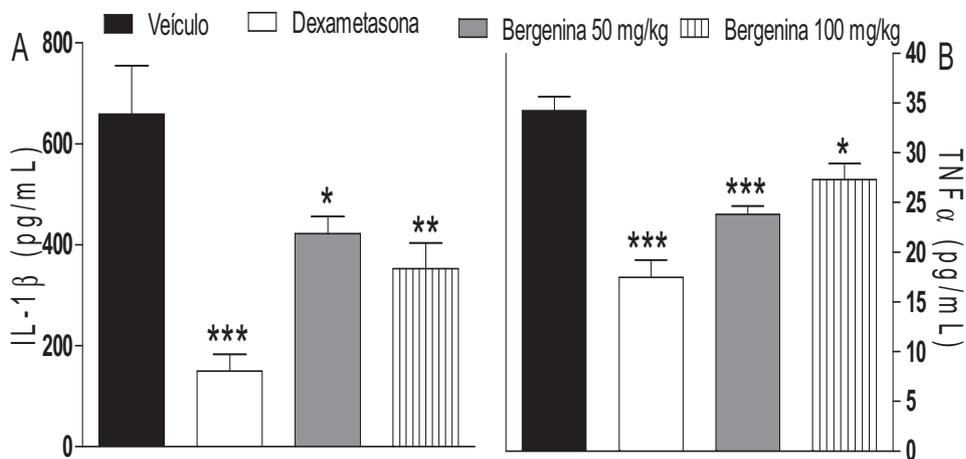


**Figura 10.** Efeitos do tratamento bergenia no adjuvante completo de Freund (CFA) indução de uma inflamação na pata. (A) hiperalgesia inflamatória medidos aos 2, 4 e 6 h após o estímulo intraplantar CFA. (B) e (C) edema da pata medido a 2 e 6 h, respectivamente, após a injeção de CFA. Bergenia (50 e 100 mg / kg) ou veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle) foi administrada por via intraperitoneal 40 minutos antes do CFA (injetado no tempo zero). Dexametasona (DEXA e 2,0 mg / kg, IP), o medicamento de referência, foi administrada 4 horas antes da CFA. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM; n = 6 animais por

grupo. \* Significativamente diferente do grupo controle (P <0,01); \*\* significativamente diferente do grupo controle (P <0,001). Conforme determinado pela ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

#### 4.4 – Efeito da bergenia sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias

O pré-tratamento com bergenia nas doses de 50 e 100 mg/Kg reduziu significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  (Fig. 11A) e TNF- $\alpha$  (Fig 11B) nas patas inflamadas quando comparados com o grupo tratado com veículo. A dexametasona (0,5 mg/kg), controle positivo, também reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .



**Figura 11.** Efeito do tratamento com bergenia em IL-1 $\beta$  (a) e TNF- $\alpha$  (b) . Os camundongos foram injetados com bergenia (50 e 100 mg / kg), veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle) ou dexametasona (2 mg / kg) por via intraperitoneal 40 minutos antes da injeção intraplantar de adjuvante completo de

Freund (CFA). Grupo salina receberam injeção intraplantar de solução salina (10 ul / pata) em vez de CFA. Os níveis de pata de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram medidos por ELISA de 3 h após a injeção de CFA. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM; n = 6 animais por grupo. \* Significativamente diferente do grupo controle (P <0,05); \*\* significativamente diferente do grupo controle (P <0,01); \*\*\* significativamente diferente do grupo controle (P <0,001). Conforme determinado pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

#### ***4.5 – Contribuição de IL-10 para a antinocicepção da bergenia***

O possível envolvimento de IL-10, uma citocina antiinflamatória, com o efeito antinociceptivo da bergenia também foi avaliada. Os dados do ELISA (Fig. 12B) mostraram que os níveis de IL-10 da pata não foram alterados pelo pré-tratamento com bergenia (100 mg / kg IP) em relação aos camundongos tratados com o veículo. Além disso, o tratamento com bergenia produziu um perfil semelhante de antinocicepção em camundongos WT e IL-10 KO (Fig. 12A).

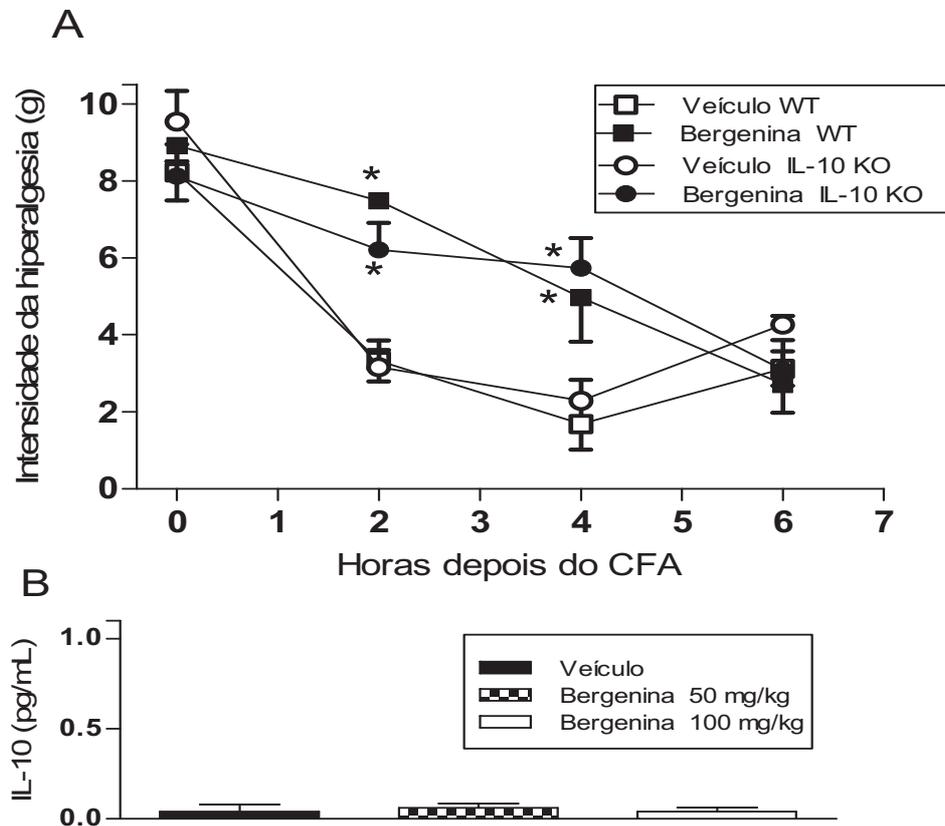


Figura 12. Efeitos da bergenia sobre os níveis de IL-10 e na pata de camundongos, hiperalgesia inflamatória IL-10-deficiente. (A) Hiperalgesia inflamatória medidos aos 2, 4 e 6 h após a administração intraplantar do adjuvante completo de Freund. Camundongos C57BL / 6 IL-10-deficiente (KO IL-10) ou C57BL / 6 do tipo selvagem (WT), foram injetados com bergenia (100 mg / kg) ou veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle) por via intraperitoneal percurso 40 minutos antes do CFA (injetado no tempo zero). (B) os níveis de IL-10 na pata verificados pelo método ELISA de 3 h após o CFA. C57BL / 6 do tipo selvagem (WT), camundongos foram

injetados com bergenina (50 e 100 mg / kg) ou veículo por via intraperitoneal 40 minutos antes do CFA. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM; n = 6 animais por grupo. \* Significativamente diferente do grupo controle (P <0,01). Conforme determinado pela ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

#### **4.7. Efeito da bergenina no desempenho motor dos camundongos**

A avaliação da interferência da bergenina no desempenho motor dos camundongos e possíveis efeitos neurológicos foram realizadas nos testes do rot rod e campo aberto (Figura 13). O tratamento com bergenina (100 mg/Kg) não alterou o tempo de permanência dos camundongos no rota rod (Fig. 13A), nem o número de quadrados atravessados no teste de campo aberto (Fig. 13B). Esses resultados indicam que a bergenina não induz alterações na coordenação motora, atividade locomotora, e comportamento exploratório. Validando os dados experimentais, o diazepam (10 mg/Kg IP), utilizado como droga de referência, induziu severa diminuição no tempo de permanência no rota rod e no número de quadrados atravessado no campo aberto, em relação ao grupo controle.

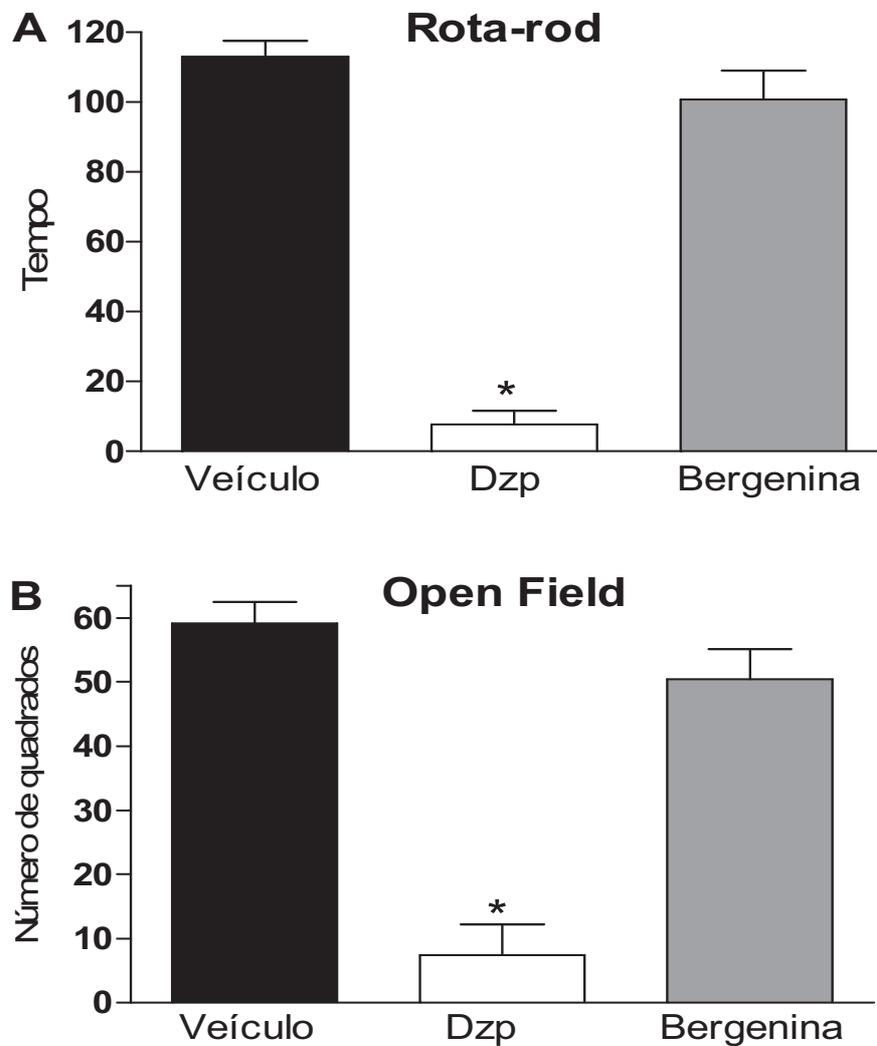


Figura 13. Efeitos da bergenia na função motora. Gráficos de barras que representa (A) o tempo de execução no rota-rod e (B) o número de travessias quadrados no teste do campo aberto, 40 minutos após a injeção intraplantar de bergenia (100 mg / kg), diazepam (DZP, 10 mg / kg, ip) ou veículo (DMSO 2% em solução salina, grupo controle). Os dados são de relatório como média  $\pm$  SEM; n = 6

animais por grupo. \* Significativamente diferente do grupo controle (P <0,001).

Conforme determinado pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

#### **4.8- Citotoxicidade da bergenina**

No ensaio de citotoxicidade in vitro (Tabela 1), a bergenina (1, 10 and 100 µg/mL) não apresentou citotoxicidade, o que não permitiu o cálculo da concentração letal para 50% (LC50). A saponina, usada como controle positivo, apresentou LC50 de 1,9 µg/ml.

Tablela 1.Citoxicidade da Bergenina

| Substância | LC <sub>50</sub> (µg/mL)   |
|------------|----------------------------|
| Bergenina  | não calculado; > 100 µg/mL |
| Saponina   | 1,9 µg/mL                  |

#### **4.8- Toxicidade gástrica da bergenina**

O tratamento diário com a bergenina demonstrou-se seguro do ponto de vista de ocorrências de inflamação gástrica e indução de úlcera em doses terapêuticas. A avaliação histológica do estômago revelou uma mucosa intacta, sem infiltrado inflamatório, edema, erosão, ou necrose em camundongos tratado diariamente com bergenina (Tabela 2 e Figura 14).

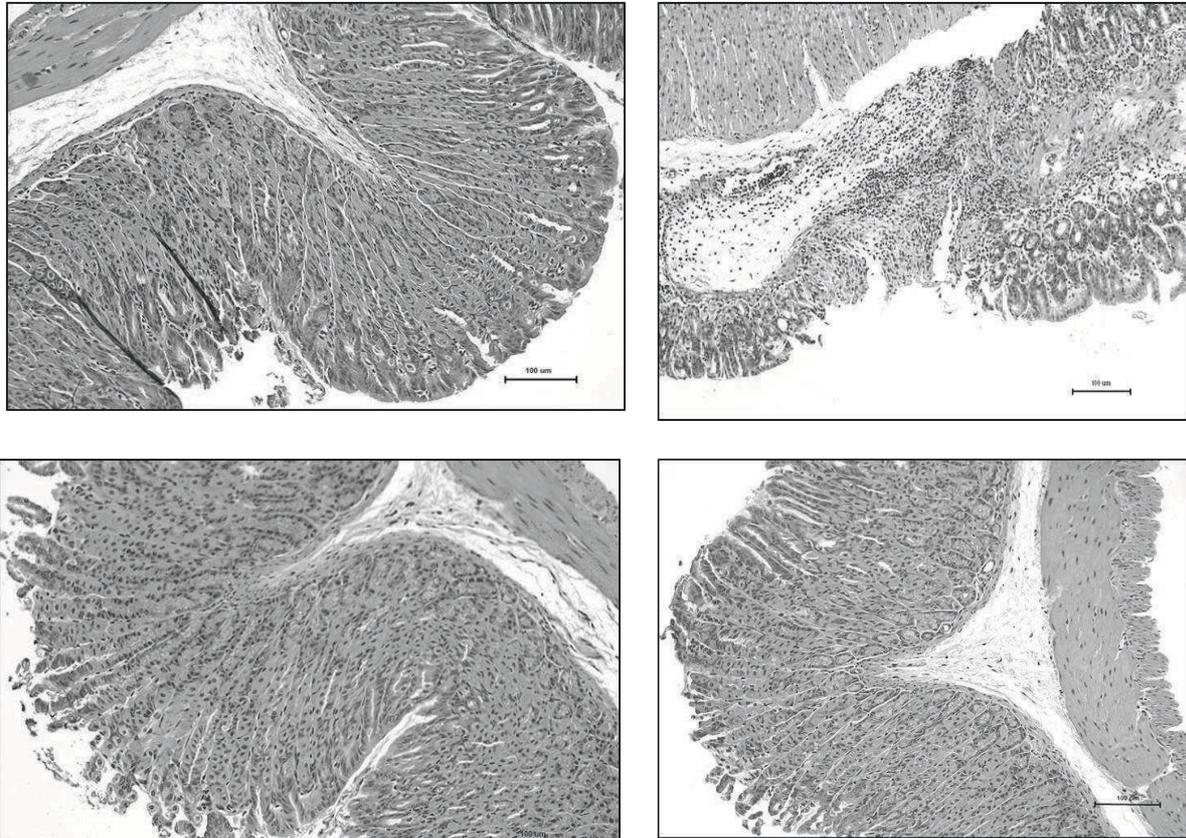


Figura 14. A análise histopatológica dos estômagos dos ratos após administração diária de bergenina. Painel A: ausência de eventos inflamatórios e problemas de danos ao tecido no estômago de camundongos tratados oralmente com veículo (DMSO 2% em salina). Painel B: infiltrado de células inflamatórias (setas pretas), edema (seta vazada), perda de células epiteliais e necrose (seta branca) no estômago de ratos tratados por via oral com indometacina (10 mg / kg). Painéis C e D: seções gástrica de ratos após a administração oral de bergenina (50 e 100 mg / kg, respectivamente). Seções gástrica corados com hematoxilina e eosina, 20 X.

Tabela 2. Efeitos gástricos do tratamento diário com bergenina

| Tratamento          | Índice de células inflamadas | Índice de erosão | Índice de edema | Índice de necrose |
|---------------------|------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| Controle            | 0.167±0.167                  | 0                | 0.33±0.21       | 0                 |
| Indometacina        | 4.0±0.4 *                    | 3.0±0.6*         | 2.6±0.6*        | 0                 |
| Bergenina 50 mg/kg  | 0.167±0.167                  | 0                | 0.167±0.167     | 0                 |
| Bergenina 100 mg/kg | 0.25±0.25                    | 0                | 0.25±0.25       | 0                 |

Valores são expressos como média ± EPM de seis ratos por grupo. \* P <0,05 comparado com camundongos tratados com o veículo (grupo controle). Conforme determinado pela ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

#### **4.10 – Toxicidade sistêmica da administração diária de bergenina**

O tratamento com bergenina (50 e 100 mg / kg, IP), em esquema de dose única, durante sete dias consecutivos, não afetou a massa corporal dos animais e não induziu quaisquer alterações na aparência geral ou sinais de toxicidade nos animais quando comparado aos camundongos tratados com veículo. Os valores obtidos para uréia e creatinina, usados como parâmetro da função renal, não diferiram dos controles (Tabela 3). Além disso, a função do fígado, avaliados através de enzimas hepáticas (ALT e AST), e o número de leucócitos circulantes não foram alterados pelo tratamento bergenina em comparação aos controles.

Tabela 3. Efeitos sistêmicos do tratamento diário com bergenina

| Paramêtros   | Tratamento diário (0.2 mL/PO) |                         |                          |
|--|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
|  | Veículo                       | Bergenina<br>(50 mg/kg) | Bergenina<br>(100 mg/kg) |
| Total leucócitos x<br>10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | 7.9 ± 0.9                     | 8.1 ± 0.3               | 8.2 ± 0.5                |
| Creatinina (mg/dL)                                     | 0.16 ± 0.08                   | 0.10 ± 0.04             | 0.16 ± 0.03              |
| Uréia(mg/dL)   | 38.5 ± 1.5                    | 39.2 ± 2.9              | 43.6 ± 3.7               |
| ALT (U/L)  | 58.6 ± 5.8                    | 49.7 ± 1.6              | 55.0 ± 3.6               |
| AST (U/L)  | 78.3 ± 6.9                    | 76.0 ± 5.1              | 71.6 ± 3.8               |

Os valores são expressos em média ± SEM de seis animais por grupo. Conforme determinado pela ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

## 5.0 - DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a administração sistêmica de bergenina, em doses que não induzem toxicidade sistêmica ou alteração do desempenho motor, produzindo consistente efeitos antinociceptivo em diferentes modelos de dor inflamatória. O efeito antinociceptivo bergenina provavelmente mediada por inibição da TNF  $\alpha$  e IL- $\beta$ , enquanto que a produção IL-10 não está envolvido.

A administração intraperitoneal de bergenina produziu antinocicepção dose-dependente, quando avaliadas no teste da contorção induzidas por ácido acético, uma ferramenta de triagem para avaliação de propriedades analgésicas e antiinflamatórias de novas substâncias (Collier et al., 1968). O efeito antinociceptivo da bergenina foi confirmado no teste da formalina, um modelo de dor inflamatória que tem duas fases distintas que podem indicar tipos diferentes de dor (Hunskar e Hole, 1987). A fase inicial, denominada dor não-inflamatória, é um resultado da estimulação direta de nociceptores e reflete a dor mediada centralmente ; a fase final, denominada dor inflamatória, é causada pela inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia (Hunskar e Hole , 1987). No presente estudo observou-se que a administração da bergenina têm atividade antinociceptiva induzida tanto nas fases precoce e tardia do teste de formalina. Além disso, nós descartamos efeitos relaxantes ou déficit motor, já que a administração bergenina, nas doses terapêuticas, não afetou o desempenho motor dos camundongos , quando testados no rota rod e open field. Esses resultados confirmam o efeito antinociceptivo da bergenina sugerido pelos testes nociceptivos.

Diante da propriedade inibitória da bergenina sobre a segunda fase da formalina, sugerimos que sua atividade antinociceptiva é devido, pelo menos em parte, a uma ação antiinflamatória. Em consonância com essa idéia, bergenina é relatado para ter atividade antiinflamatória (Swarnalakshmi et al, 1984;.. El Jachak menos, 2010). Na tentativa de verificar a relação entre as propriedades antinociceptiva e antiinflamatória do bergenina, os efeitos do tratamento bergenina foi avaliada em modelo experimental de destaque usado para a seleção de novos antiinflamatórios: o CFA – Inflamação na pata induzida por CFA. A administração da bergenina resultou em uma acentuada inibição de importantes eventos relacionados à resposta inflamatória, tais como edema, hiperalgesia e aumento no tecido dos níveis de IL-1  $\beta$  e TNF-  $\alpha$ . Recentemente foi relatado que a bergenina demonstrou atividade anti-artrítica que está correlacionada com a inibição da produção IL-2, IFN-  $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Nazir et al., 2007).

Hoje em dia, é bem aceito que as citocinas constituem um elo entre as lesões celulares ou reconhecimento imunológico e os sinais de inflamação (Ferreira et al, 1988;.. Faccioli et al, 1990;.. Dinarello, 2000). Diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos e células gliais, produzem IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$  que por sua vez induz a produção de outros mediadores inflamatórios envolvidos com o recrutamento celular, febre, liberação de proteínas de fase aguda, aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia ( Dinarello, 1998).

Considerando o importante papel da IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$  durante a resposta inflamatória sugerimos que o efeito antiinflamatório da bergenina pode estar relacionada à sua capacidade de inibir a liberação dessas citocinas. Um papel chave da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  sobre a hiperalgesia inflamatória tem sido demonstrada. É sabido que uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, que inclui

TNF  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , precede a liberação dos mediadores finais de hiperalgesia, ou seja, prostaglandinas e aminas simpáticas (Cunha et al, 2005;. Verri Júnior et al. , 2006).

Antagonistas de citocinas foram capazes de reduzir a hiperalgesia inflamatória em camundongos, indicando que a ativação de citocinas é um passo importante no desenvolvimento da dor inflamatória (Cunha et al., 2003). IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$  estimula a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas (Zucali et al, 1986;. Crofford et al, 1994;.. Schfers et al, 2003) envolvidos com a sensibilização nociceptiva (Ferreira & Nakamura, , 1979). Corroborando essa idéia, a injeção local de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  produz hiperalgesia depende da liberação de prostanóides (Ferreira et al, 1988;. Cunha et al, 1992).

Aqui, descrevemos que a bergenina reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , devido a isso pode levar à inibição da produção de prostanóides, é possível que a bergenina atua impedindo a sensibilização nociceptiva. Desde a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum dos diferentes tipos de dor, a redução da produção de IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$  pode ser responsável pelo efeito antinociceptivo da bergenina aqui descritos.

De fato, Woolf et al. (1997) mostraram que o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  medeia a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de CFA. Da mesma forma, o papel do TNF- $\alpha$  em modelos de dor realizado pelo teste da formalina e evocado comportamento com flinch e o teste do ácido acético evocadas por contorções foi demonstrado, desde o pré-tratamento com anti-TNF- $\alpha$  que reduz parcialmente os comportamentos nociceptivos nesses modelos. (Ribeiro et al., 2000; Granados-Soto et.al.,2001).

As citocinas pró e anti-inflamatórias são mediadores cujo balanço modula a intensidade da hiperalgesia inflamatória (Verri-Júnior et al., 2006). Citocinas

induzem a hiperalgesia e dor inflamatória (Cunha et al., 2005), enquanto as citocinas antiinflamatórias, inibem a produção de outras citocinas e mediadores de hiperalgesia final, reduzindo a dor inflamatória (Poole et al. 1995, Cunha et al., 1999). A IL-10 é uma citocina anti-hiperalgesia produzida por células inflamatórias. Tem sido demonstrado que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (Fiorentino et al, 1991;. Kasama et al, 1995). Além disso, a IL-10 inibe a hiperalgesia induzida pela administração local de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Poole et al., 1995), dada a capacidade da da IL-10 para inibir a produção de TNF-  $\alpha$ . No estudo nós investigamos a possibilidade de que a produção da IL-10 contribui para a antinocicepção bergenina durante condições inflamatórias.

A fim de verificar a participação da IL-10 para a antinocicepção bergenina, foi verificado que a administração da bergenina produziu um perfil semelhante de antinocicepção no tipo selvagem em camundongos IL-10-deficiente. Além disso, a produção local de IL-10 não foi alterada pelo tratamento bergenina. Nazir et al. (2007) mostrou que bergenina inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-2, IFN-  $\gamma$  e TNF-  $\alpha$ ), e Th2 (IL-4 e IL-5) no sangue periférico de ratos artríticos.

IL-4 é essencialmente produzida por linfócitos Th2 e mastócitos. Tem sido demonstrado que a administração local de IL-4 reduz a hiperalgesia inflamatória, e que este efeito está associado com a inibição do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 (Cunha et al., 1999). Considerando os dados da literatura, é possível que os efeitos antinociceptivos da bergenina envolvem a indução de IL-4, mas esta hipótese precisa ainda ser confirmada. A administração a longo prazo das drogas disponíveis antiinflamatória, analgésica pode levar ao desenvolvimento de vários efeitos colaterais, tais como uma ameaça úlceras gastrointestinais, hemorragia, distúrbios

renais e imunossupressão (Peskar, 1977; Tapiero et al, 2002;. Schacke et al. , 2002). Levando em consideração esta possibilidade, os efeitos sistêmicos da bergenina foram estudados. O tratamento bergenina diário foi encontrado em segurança do ponto de vista gástrica, eventos inflamatórios e indução de úlcera em doses terapêuticas. Nem a função renal e hepática, nem o número de leucócitos circulantes foi alterada pelo tratamento diário com bergenina. Além disso, a toxicidade aguda bergenina teste foi encontrado para ser seguro até 2 g / kg por peso corporal, sem nenhum sinal de mortalidade ou alteração no padrão comportamental (Nazir et al., 2007). A baixa toxicidade e os efeitos sistêmicos incentivando relatados aqui reforçam o potencial do bergenina para o desenvolvimento farmacológico. Em contraste com os não-esteróides anti-inflamatórios, os inibidores das actividades de produção de citocinas apresentam modificadores da doença em modelos animais de inflamação crônica (Geiger et al., 1994). Assim, a regulação de citocinas por agentes não-tóxico é uma estratégia terapêutica para o controle de doenças inflamatórias. Em consonância com essa idéia, as terapias anti-TNF- $\alpha$  foram mostrados para ser eficazes em diferentes doenças que estão associadas à dor, tais como uveíte e artrite reumatóide (Smith et al, 2005). (Moreland, 1999; Haraoui, 2005). Os resultados apresentados sugerem que bergenina possui atividades analgésica e antiinflamatória , constituindo uma associada inibição da liberação de IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$ , possibilidade atraente para o desenvolvimento farmacológico. Além disso, a ausência de sinais de toxicidade sistêmica, sugerir uma terapêutica para a segurança das doses farmacologicamente ativo. No entanto, os mecanismos precisos através dos quais bergenina exerce sua ação estão atualmente sob investigação.

## 6.0 – CONCLUSÕES

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

- A bergenina possui atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor inflamatória;
- A atividade antinociceptiva da bergenina parece estar relacionada às suas propriedades antiinflamatórias e inibição da síntese e/ou liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ;
- IL-10, uma citocina antiinflamatória, não contribui para a atividade antinociceptiva da bergenina;
- Doses terapêuticas de bergenina não induzem alteração da função motora;
- Diferente dos analgésicos-antiinflamatórios atualmente disponíveis, a bergenina apresenta baixa toxicidade gástrica em doses terapêuticas;
- A bergenina apresenta baixa citotoxicidade;
- A bergenina apresenta baixa toxicidade, uma vez que sua administração sub-crônica não induz sinais de toxicidade geral ou mortalidade, nem induz toxicidade renal e hepática, sugerindo uma segurança terapêutica para as doses farmacologicamente ativas.
- A bergenina pode ser considerada boa candidata para o desenvolvimento farmacológico de novos analgésicos.

## 7.0 – REFERÊNCIAS

- Basbaum, A. I. and C. J. Woolf (1999). "Pain." *Curr Biol* 9(12): R429-31.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000;33:179–89.
- Collier, H. O., L. C. Dinneen, et al. (1968). "The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse." *Br J Pharmacol Chemother* 32(2): 295-310.
- Crofford, L. J., R. L. Wilder, et al. (1994). "Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids." *J Clin Invest* 93(3): 1095-101.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992;107(3):660–4.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Veiga FH, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol* 1999;126(1):45–50.
- Cunha JM, Sachs D, Canetti C, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. *Br J Pharmacol* 2003;139:1135-45.

- Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1755–60.
- Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16:457-99
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-8.
- Dubner, R. and M. A. Ruda (1992). "Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation." *Trends Neurosci* 15(3): 96-103.
- Dubuisson, D. and S. G. Dennis (1977). "The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats." *Pain* 4(2): 161-74.
- Faccioli LH, Souza GE, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Recombinant interleukin-1 and tumour necrosis factor induce neutrophil migration 'in vivo' by indirect mechanisms. *Agents Actions* 1990;30:344-9
- Ferreira SH, Nakamura M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins* 1979;18:179-90.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 1988;334:698-700.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815–22.
- Geiger, T., C. Rordorf, et al. (1994). "CGP 47969A: effect on collagen induced arthritis in DBA/1 mice." *J Rheumatol* 21(11): 1992-7.

- Goel RK, Maiti RN, Manickam M, Ray AB. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa. *Ind J Exp Biol* 1997;35:1080–83.
- Goodman and Gilman (2005). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill.
- Granados-Soto V, Alonso-Lopez R, Asomoza-Espinosa R, Rufino MO, Gomes-Lopes LD, Ferreira SH. Participation of COX, IL-1beta and TNF alpha in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc* 2001;44:15–17.
- Haraoui B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2005;72:46–7.
- Hunskar, S. and K. Hole (1987). "The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain." *Pain* 30(1): 103-14.
- Jachak SM, Gautam R, Selvam C, Madhan H, Srivastava A, Khan T. Anti-inflammatory, cyclooxygenase inhibitory and antioxidant activities of standardized extracts of *Tridax procumbens* L. *Fitoterapia*. 2010 in press.
- Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* 413(6852): 203-10.
- Jahromi MAF, Chansouri JPN, Ray AB. Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggea microcarpa*. *Phytother Res* 1992;6:180–3.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203–10.
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 1995;95:2868–76.

- Kassuya CA, Silvestre AA, Rehder VL, Calixto JB. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2003;478:145-53.
- Laine L, Weinstein WM. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1988;94:1254-62.
- Lanas, A. and A. Ferrandez (2006). "NSAID-induced gastrointestinal damage: current clinical management and recommendations for prevention." *Chin J Dig Dis* 7(3): 127-33.
- Lim HK, Kim HS, Choi HS, Oh S, Choi J. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. *J Ethnopharmacol* 2000;72:469–74.
- Moreland LW. The role of cytokines in rheumatoid arthritis: inhibition of cytokines in therapeutic trials. *Drugs Today (Barc)* 1999; 35:309–19.
- Nazir N, Koul S, Qurishi MA, Taneja SC, Ahmad SF, Bani S, Qazi GN. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis—A flow cytometric study. *J Ethnopharmacol* 2007;112:401–5.
- Peskar, B. M. (1977). "On the synthesis of prostaglandins by human gastric mucosa and its modification by drugs." *Biochim Biophys Acta* 487(2): 307-14.
- Piacente S, Pizza C, Detommasi N. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity. *J Nat Prod* 1996;59:565–9.
- Piegen X. Traditional experience of Chinese herb medicine. Its applications in drug research and new drug searching. In: Beal JL, Reinhard E, editors, *Natural*

Products as Medicinal Agents. Stuttgart: HippokratesVerlag; 1980. p. 100-117

Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol* 1995;115:684–8.

Pu HL, Huang X, Zhao JH, Hing A. Bergenin is the antiarrhythmic principle of *Fluggea virosa*. *Planta Med* 2002;68:372–4.

Ribeiro RA, Vale ML, Ferreira SH, Cunha FQ. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 2000;391:97–103.

Robert, A. (1976). "Antisecretory, antiulcer, cytoprotective and diarrheogenic properties of prostaglandins." *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2: 507-20.

Rodrigues ALS, Silva GL, Matteussi AS, Fernandes E, Miguel O, Yunes RA, et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* 2002;70:1347–58.

Santiago HC, Pires MFB, Souza DG, Roffe E, Côrtes DF, Tafuri, W.L., et al. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon-g upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Microbes Infect* 2006;8:2569-77.

Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23-43.

Schaible, H. G. and F. Richter (2004). "Pathophysiology of pain." *Langenbecks Arch Surg* 389(4): 237-43.

- Schafers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain* 2003;104:579–88.
- Smith JA, Thompson DJ, Whitcup SM, Suhler E, Clarke G, Smith S, et al. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;53:18–23.
- Swarnalakshmi T, Sethuraman MG, Sulochana N, Arivudainambi R. A note on the anti-inflammatory activity of bergenin. *Curr Sci* 1984;53:917.
- Takahashi H, Kosaka M, Watanabe Y, Nakade K, Fukuyama Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorg Med Chem* 2003;11:1781–8.
- Tapiero, H., G. N. Ba, et al. (2002). "Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies." *Biomed Pharmacother* 56(5): 215-22. Teixeira, M. J. and J. A. B. Figueiró. Dor evolução histórica dos conhecimentos Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento: 8-13.
- Vaz ZR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:304-12.
- Verri-Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006;112:116-38.

Winter, C. A., E. A. Risley, et al. (1962). "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs." *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544-7.

Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* 1997; 121:417-24.

Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." *Pain* 16(2): 109-10.

Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* 1986;77:1857-63