



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



Atividade antinociceptiva, antiartrite gotosa e antioxidante de *Lychnophora pinaster*

CAMILA HELENA BARROS

**OURO PRETO – MG
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**“Atividade antinociceptiva, antiartrite gotosa e antioxidante de
Lychnophora pinaster”**

Autora: Camila Helena Barros

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – PPG CIPHARMA, da Universidade Federal de Ouro Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa: Fármacos e Medicamentos

**Laboratório de Plantas Medicinais - LAPLAMED
Escola de Farmácia – UFOP**

**OURO PRETO, MG
2019**

B268a Barros, Camila Helena.
Atividade antinociceptiva, antiartrite gotosa e antioxidante de *Lychnophora pinaster* [manuscrito] / Camila Helena Barros. - 2019.
76f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. *Lychnophora pinaster*. 2. Dor- Tratamento. 3. Inflamação. I. Guimarães, Dênia Antunes Saúde . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615.3

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 155ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Camila Helena Barros**, com a defesa da dissertação intitulada: “Atividade antinociceptiva, antiartrite gotosa e antioxidante de *Lychnophora pinaster*”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 10 de junho de 2019.



Prof. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa
UFJF



Prof. Dra. Andrea Crabe Guimarães
UFOP



Prof. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães
UFOP

Dedico este trabalho a meus pais que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, que nunca me deixaram desistir nas horas difíceis e que junto a mim esperam, com certeza, pelo sucesso dessa conquista. Dedico também a Deus por não me deixar perder a fé, sempre!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas em minha vida.

Tenho muito a agradecer a todos que de alguma forma participaram da realização desse trabalho, em especial:

À professora Dênia pela maneira doce e carinhosa de saber orientar e ensinar, que tem sido, nos meus dias, uma grande inspiração como pessoa, professora e pesquisadora.

À Rafaela Cunha que se tornou minha “gêmea”, amiga, companheira e que teve um papel importante no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do LAPLAMED pela convivência diária e ajuda, Ana Catharina, Grazielle, Camila Muller, Marcela, Arthur, Amanda Quaresma e Rafaela.

Às alunas de iniciação científica, Manuela e Juliana, por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao auxílio e amizade aos colegas do LCQ, em especial, Tamires e Débora.

Aos técnicos, professores e funcionários do PPG Cipharma, pelo suporte diário e ensinamentos.

Ao técnico Rodrigo Dian e ao LIMP pela disposição do laboratório e citômetro.

À professora Andrea Grabe Guimarães, por disponibilizar o analgesímetro do laboratório de farmacologia e por ter contribuído com este trabalho em minha banca de qualificação.

À professora Carmen Aparecida de Paula, pelas contribuições em minha qualificação.

À professora Andréia Alzamora, por disponibilizar o homogeneizador e por ser suplente em minha qualificação.

À professora Luciana Guzzo pela disponibilidade em participar da minha defesa.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Regina e Carlos, pelo amor, conselhos diários e por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, César e Junior, pelo suporte, carinho e incentivo.

À minhas avós, Ofélia e Yolanda, pelas orações.

À minha amiga Cíntia, pelas orações, amizade e por sempre estar presente mesmo com a distância.

Aos meus padrinhos, Regina e Tabajara, pelo incentivo e por sempre estarem presentes em minhas conquistas.

À toda minha família, amigos, tios e primos, que com carinho, torceram por mim e contribuíram com essa conquista.

À República Atena e todas as Deusas, pela amizade, torcida e carinho, que foram essenciais durante todos esses anos.

Às amigas que dividiram casa comigo “La em casa”, pelo convívio diário.

A todos os amigos de Ouro Preto e São José dos Campos.

**ESTE TRABALHO FOI FINANCIADO PELA FAPEMIG, CAPES E
UFOP**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticoide
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASIC	Canal de íon sensível ao ácido
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CAT	Catalase
C5a	Complemento 5 ativado
C5aR	Receptor do complemento 5 ativado
B1	Receptor de bradicinina 1
B2	Receptor de bradicinina 2
BLT1	Receptor de leucotrieno 1
BLT2	Receptor de leucotrieno 2
COX	Ciclo-oxigenase
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CXCL 1	Quimiocina CXCL 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEL	Extrato etanólico das folhas
EP3	Receptor de prostaglandina E2
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EMA	<i>Euro-pean Medicines agency</i>
ETA	Receptor de endotelina do tipo A
ETB	Receptor de endotelina do tipo B
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPx	Glutaciona peroxidase
GRD	Glânglio da raiz dorsal
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida

HIV / SID	Human immunodeficiency vírus / Síndrome da Imunodeficiência adquirida
IL-1	Interleucina 1 α
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL- 33	Interleucina 33
IL-1R	Receptor de interleucina 1
INF	Interferon
INOS	Óxido nítrico sintase
i.p	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LT α	Linfotoxina α
LT β	Linfotoxina β
LTB4	Leucotrieno B4
MSU	Cristais de urato monossódico
NaV1.8	Canal de sódio controlado por voltagem alfa VIII
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear eritróide 2
PAF	Fator estimulador de plaquetas
PGES	Prostaglandina E sintase terminal
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
P2X2	Purinoceptor do canal de íon controlado por ligante 2
P2X3	Purinoceptor do canal de íon controlado por ligante 3
P2X7	Purinoceptor do canal de íon controlado por ligante 7
SOD	Superóxido dismutase
TACE	Enzima de conversão do TNF- α
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral

TNRF	Receptor de fator de necrose tumoral
TRPM8	Receptor de potencial transitório melatatina 8
TRPA1	Receptor ionotrópico de potencial transitório A1
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório 1
URAT 1	Trocador de ânion urato renal 1
Vit C	Vitamina C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via das purinas (Adenina e Guanina)	3
Figura 2: Dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água	6
Figura 3: Dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio.....	6
Figura 4: Representação esquemática da via ascendente da dor.	9
Figura 5: Medicamentos e suas vias de ação para o tratamento da Gota	15
Figura 6: <i>Lychnophora pinaster</i> , à direita indivíduo jovem e à esquerda indivíduo adulto...	17
Figura 7: <i>L. pinaster</i> , a – ramo ; b – cúpula.....	20
Figura 8: Camundongos em adaptação ao ambiente para iniciar o experimento de hipernocicepção.....	31
Figura 9: Imagem da medição da hipernocicepção com o equipamento analgesímetro. .	31
Figura 10: Delineamento experimental para avaliação da atividade antiartrite gotosa e estresse oxidativo do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> e de seus constituintes químicos principais.	39
Figura 11: Efeitos da indometacina e do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL) nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, sobre a nocicepção em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por cristais de urato monossódico (MSU).....	41
Figura 12: Efeito das principais substâncias presentes no extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> , na dose de 15 mg/kg, e da indometacina sobre a nocicepção em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por MSU (inflamação).....	42
Figura 13: Gráficos obtidos com o software Flow Jo para determinação do quadrante Q3 do branco (amostra sem o marcador de neutrófilos (Ly6 G). Determinação do quadrante da região de leucócitos totais (A). Demarcação do quadrante Q3, onde estão situados os leucócitos marcados com Ly6 G, que são os neutrófilos (B). Histograma gerado à partir dos leucócitos totais e região demarcada de neutrófilos (C).	43
Figura 14: Gráficos obtidos com o software Flow Jo na análise da amostra tratada com ácido clorogênico, substância presente na <i>Lychnophora pinaster</i> , com marcador de neutrófilos (Ly6 G). Determinação do quadrante da região de leucócitos totais (A). Demarcação do quadrante Q3, onde estão situados os leucócitos marcados com Ly6 G, que são os neutrófilos (B). Histograma gerado à partir dos leucócitos totais e região demarcada de neutrófilos (C).	44

Figura 15: Efeitos do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL), nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias (15 mg/kg) presentes na planta e da indometacina sobre a migração de neutrófilos para a cavidade periarticular da articulação fêmur-tibial em camundongos C57BL/6 com indução de artrite por MSU (inflamação).....	45
Figura 16: Efeito do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL), nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias presentes na planta e da indometacina sobre a atividade da citocina IL-1 β presente no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial em camundongos C57BL/6 com indução de artrite por MSU (inflamação)..	46
Figura 17: Efeitos do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL), nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias presentes na planta e da indometacina sobre a concentração da citocina TNF- α na cavidade periarticular da articulação fêmur-tibial em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por MSU (inflamação).....	47
Figura 18: Comparação dos efeitos do extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL) nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg e da Vitamina C, composto antioxidante padrão, sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em camundongos C57BL/6 com indução de artrite por MSU (inflamação).....	48
Figura 19: Efeitos das principais substâncias presentes em <i>Lychnophora pinaster</i> , na dose de 15 mg/kg, e da vitamina C, composto antioxidante padrão, sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em camundongos C57BL/6 com indução de artrite por MSU (inflamação).	49
Figura 20: Efeito do extrato de <i>Lychnophora pinaster</i> (EEL) nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg e da vitamina C, composto antioxidante padrão, sobre a atividade da enzima Catalase (CAT) em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por MSU (inflamação). .	50
Figura 21: Efeito das principais substâncias presentes em <i>Lychnophora pinaster</i> , na dose de 15 mg/kg, e da vitamina C, composto antioxidante padrão sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em camundongos C57BL/6 com artrite induzida por MSU (inflamação)...	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais mediadores e estímulos pró-nociceptivos e seus receptores.....	10
Tabela 2: Situação dos medicamentos para tratamento da gota de acordo com as agências reguladoras ANVISA, FDA e EMA. Fonte: Azevedo et al. (2017).....	14
Tabela 3: Atividades farmacológicas descritas na literatura para as principais substâncias encontradas em <i>L. pinaster</i> . Fonte: Silva, 2016, com adaptações.	23
Tabela 4: Resumo dos efeitos do EEL e das principais substâncias deste extrato sobre a nociceção, antiartrite gotosa e estresse oxidativo.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Artrite Gotosa	2
2.1.1 Inflamação	4
2.1.2 Estresse oxidativo	5
2.1.3 Dor e nocicepção	6
2.1.4 Citocinas	10
3. TRATAMENTO DA GOTA.....	12
3.1 Gênero <i>Lychnophora</i>	15
3.1.1 <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	16
3.1.2 Descrição botânica.....	20
3.1.3 Atividades farmacológicas de <i>Lychnophora pinaster</i> e de seus componentes químicos	21
4. OBJETIVOS	24
4.1 Gerais.....	24
4.2 Específicos.....	24
5. JUSTIFICATIVA.....	25
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
6.1 Equipamentos, instrumentos, solventes, reagentes e fármacos	27
6.1.1 Preparo de soluções	28
6.1.1.1 Solução tampão PBS concentrada 10x pH 7,2	28
6.2 Material Vegetal	29
6.2.1 Obtenção do extrato etanólico de <i>Lychnophora pinaster</i>	29
6.2.2 Obtenção dos constituintes químicos principais presentes em <i>L. pinaster</i> e utilizados para testes de atividade biológica.....	30
7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	30
7.1. Animais experimentais	30
7.2. Modelo experimental de hipernocicepção inflamatória: teste de pressão crescente na pata de camundongo (filamentos de von Frey) e da atividade antiartrite gotosa.....	30
7.1.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios	32
7.1.2 Contagem total de leucócitos.....	33
7.1.3 Contagem de neutrófilos.....	33
7.2 Dosagens das citocinas IL1- β e TNF α no tecido periarticular	34
7.3. Avaliação do estresse oxidativo	35

7.2.1	Preparo do Homogenato.....	35
7.2.2	Dosagem de proteínas totais (Método de Lowry)	35
7.2.3	Diluição do Homogenato.....	37
7.2.4	Dosagem de proteínas totais no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial.	37
7.2.5	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	37
7.2.6	Atividade da Catalase (CAT).....	38
7.4.	Análise Estatística.....	38
8.	RESULTADOS	40
8.1.	Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato de <i>L. pinaster</i> e de seus constituintes químicos sobre a hiperalgesia induzida pelo MSU.	40
8.2.	Avaliação dos parâmetros inflamatórios.....	42
8.2.1	Migração de neutrófilos	42
8.2.2	Quantificação da citocina IL-1 β	45
8.2.3	Quantificação da citocina TNF- α	46
8.3.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EEL E DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRINCIPAIS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO.....	47
8.3.1.	Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	47
8.3.3.	Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)	49
9.	DISCUSSÃO	53
10.	CONCLUSÃO.....	61
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
13.	ANEXOS	75
13.1	Protocolo CEUA.....	75

RESUMO

A gota é uma enfermidade que acomete as articulações e tecidos subcutâneos devido à deposição de cristais de ácido úrico nestes locais, seguido de inflamação, dor e disfunção do membro atingido. Os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da artrite gotosa são reduzidos, sua farmacoterapia não abrange todos os sintomas da gota em apenas um medicamento e apresentam uma série de efeitos adversos, justificando a necessidade da busca por novas opções terapêuticas. As *Lychnophoras*, conhecidas popularmente como “arnica”, são espécies utilizadas na medicina popular na forma de soluções hidroalcoólicas ou pomadas para o tratamento da dor, reumatismo e inflamação. Pesquisas anteriores realizadas na UFOP demonstraram os efeitos do extrato etanólico da *Lychnophora pinaster* (EEL) sobre a hiperuricemia, inflamação e nocicepção. O presente estudo avaliou os efeitos do EEL e de seus constituintes químicos principais sobre a artrite induzida por cristais de urato monossódico (MSU) na articulação fêmur-tibial de camundongos C57BL/6 e sobre o estresse oxidativo. Como resultado da atividade antinociceptiva, o EEL na maior dose avaliada, reduziu o limiar de nocicepção de maneira equivalente a indometacina, fármaco anti-inflamatório (padrão) do experimento. Provavelmente as substâncias presentes no EEL, ácido cinâmico, quercetina, lupeol e estigmasterol foram responsáveis pelo efeito antinociceptivo de EEL, sendo que o lupeol foi mais efetivo que a indometacina. Na determinação da atividade antioxidante, o EEL não apresentou efeito sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido periarticular. Das substâncias avaliadas, apenas vitexina promoveu o aumento da atividade da CAT e o ácido *E*-licnofórico estimulou o aumento tanto da atividade da SOD quanto da CAT. A redução da migração de neutrófilos para a cavidade periarticular da articulação fêmur tibial dos camundongos foi observada nos grupos tratados com diferentes doses do EEL e nos grupos tratados com as substâncias presentes em *L. pinaster*, ácido cinâmico, rutina, quercetina, vitexina, lupeol, estigmasterol, ácido cafeico e ácido clorogênico. Neste trabalho o efeito anti-inflamatório do EEL observado, ocorreu pela inibição da migração de neutrófilos e pela redução das concentrações das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , na região inflamada. Todas as substâncias detectadas no EEL contribuíram para os efeitos do extrato sobre a artrite. O ácido cinâmico, a rutina, ácido *E*-licnofórico e o estigmasterol demonstraram sua capacidade de inibição da IL-1 β . Já o ácido cafeico e a vitexina promoveram a diminuição tanto da citocina IL-1 β , como do TNF- α . Dessa forma, o extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* e seus constituintes principais

se mostraram promissores para o tratamento da dor e inflamação decorrentes da artrite gotosa.

Palavras-chaves: *Lychnophora pinaster*, dor, inflamação, gota, neutrófilos, IL-1 β , TNF- α , SOD, CAT.

ABSTRACT

Gout is a disease that affects joints and tissues due to the deposition of uric acid crystals at these sites, followed by inflammation, pain, and dysfunction of the affected limb. Drugs currently available for the treatment of gouty arthritis are reduced and present adverse effects, justifying the need to search for new therapeutic options. *Lychnophoras* species, popularly known as "Brazilian arnica", are used in folk medicine in the form of hydroalcoholic solutions or ointments for the treatment of pain, rheumatism, and inflammation. Scientific research conducted at UFOP demonstrated the effects of the ethanolic extract from *Lychnophora pinaster* Mart. (EEL) on hyperuricemia, inflammation, and nociception. Present study evaluated effects of EEL and its main chemical constituents on arthritis induced by monosodium urate crystals on the femur-tibial joint of C57BL / 6 mice and on oxidative stress. Results of the antinociceptive activity showed that EEL, in the highest dose evaluated, decreased the nociception threshold like to indomethacin, drug used as a positive control of the experiment. Cinnamic acid, quercetin, lupeol, and stigmasterol were responsible for the antinociceptive effect of EEL, with lupeol being more effective than indomethacin. In the determination of the antioxidant activity, EEL had no effect on the activity of SOD and CAT enzymes in periarticular tissue. Of the evaluated substances, only vitexin promoted increased CAT activity and *E*-lychnophoric acid stimulated increased SOD and CAT activity. Reduction of the neutrophil migration to the periarticular cavity of the femur-tibial joint of the mice was observed in the groups treated with different doses of EEL and also in the groups treated with the substances present in EEL, cinnamic acid, rutin, quercetin, vitexin, lupeol, stigmasterol, caffeic acid and chlorogenic acid. Anti-inflammatory effect promoted of EEL was due to inhibition of neutrophil migration and the reduction of the concentrations of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in the inflamed region. All substances detected in EEL were responsible for the effects of this extract on arthritis. Cinnamic acid, rutin, *E*-lychnophoric acid, and stigmasterol demonstrated their ability to inhibit IL-1 β . Caffeic acid and vitexin promoted a decrease in both IL-1 β and TNF α cytokines. Thus, ethanolic extract of *L. pinaster* and its main constituents proved promising for the treatment of pain and inflammation resulting from gouty arthritis.

Keywords: *Lychnophora*, pain, inflammation, gout, neutrophils, IL-1 β , TNF- α

1. INTRODUÇÃO GERAL

A gota é uma artrite inflamatória, que se caracteriza quando há um distúrbio do metabolismo de purinas. Dessa forma quando os níveis séricos de urato, encontram-se superiores a 6,8 mg/dl (Tausche et al., 2009) é desencadeado a hiperuricemia, que juntamente com o aumento da síntese ácido úrico e diminuição da sua excreção pelos rins, pode haver cristalização do monourato de sódio e sua deposição nas articulações, tecidos subcutâneos e rins. Esses cristais desencadeiam uma resposta imunológica, dando origem a inflamação no local afetado (Lima et al., 2015; Lioté e Ea, 2006).

Descrita há mais de dois milénios, a gota também era conhecida como “ Doença dos Reis”. Naquela época os homens das altas classes e da realeza tinham uma vida farta de carnes e vinhos, associada ao sedentarismo (Hochberg et al., 2015). Esses fatores estão ligados a predisposição a artrite gotosa, pois o consumo em excesso de carne e vinho resultam no aumento da catabolização do ácido úrico pela via das purinas no organismo humano. Outros fatores que predispõem a gota são, o sexo masculino, mulheres na pós menopausa, obesidade, hipertensão arterial, insuficiência renal e o uso de alguns medicamentos, como os tiazídicos (Mediavilla e Miguel, 2011).

O ácido úrico é o produto final de catabolização das purinas em humanos, portanto quando há um distúrbio metabólico na sua síntese ou excreção, utiliza-se como principais recursos terapêuticos no tratamento da gota, fármacos para controle da hiperuricemia, medicamentos uricosúricos e terapia anti-inflamatória. (Souza, 2012).

Há muitos anos os seres humanos procuram na natureza alternativas que tragam melhorias a sua saúde e aos seus hábitos cotidianos, de forma que aumentem também sua expectativa e qualidade de vida (OMS, 2000). Por isso o uso das plantas medicinais já faz parte da rotina de muitas pessoas. Nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia aumentou consideravelmente entre os grupos de usuários, pesquisadores e servidores da saúde pública. Dados relatados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmaram esse estudo, indicando que 80 % da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85 % usam plantas medicinais ou preparações destas. Sendo assim, os estudos sobre a etnobotânica e etnofarmacologia das plantas medicinais tem tido mais foco na ciência (Oliveira, 2017).

Com isso, é necessário realizar estudo do EEL e suas substâncias majoritárias, tendo como objetivo a avaliação da atividade farmacológica na artrite gotosa, inflamação e nocicepção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Artrite Gotosa

Cerca de 200 anos a hiperuricemia é considerada a principal etiologia da gota, uma artrite inflamatória causada pela precipitação de ácido úrico nas articulações, tecidos e líquido sinovial (El-Tantawy, 2019). Grande parte dos enfermos com histórico de hiperuricemia não desenvolve a gota, porém 10% dos hiperuricêmicos manifestam a gota. (Tausche et al., 2009).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas (**Figura 1**). Em condições normais, ele encontra-se dissolvido no sangue e é eliminado através da urina para que possa ser excretado pelos rins (Heckler, 2017). A fisiopatologia da gota se inicia com a degradação das purinas no organismo humano, que origina como produto final o ácido úrico. Em alguns casos identificados em primatas, a gota está associada à ausência do gene que decodifica a uricase, uma enzima responsável pela conversão do ácido úrico em alantoína, que tem características mais solúveis que o ácido úrico, **figura 1** (Santos, 2016). Nesse caso a ausência do gene que decodifica essa enzima também resulta no MSU como produto final (Hochberg, et al., 2015). Estas purinas são provenientes da dieta, da conversão do ácido nucleico tecidual em nucleotídeos de purina e da síntese do novo de base purínicas (Strilchuk et al., 2019).

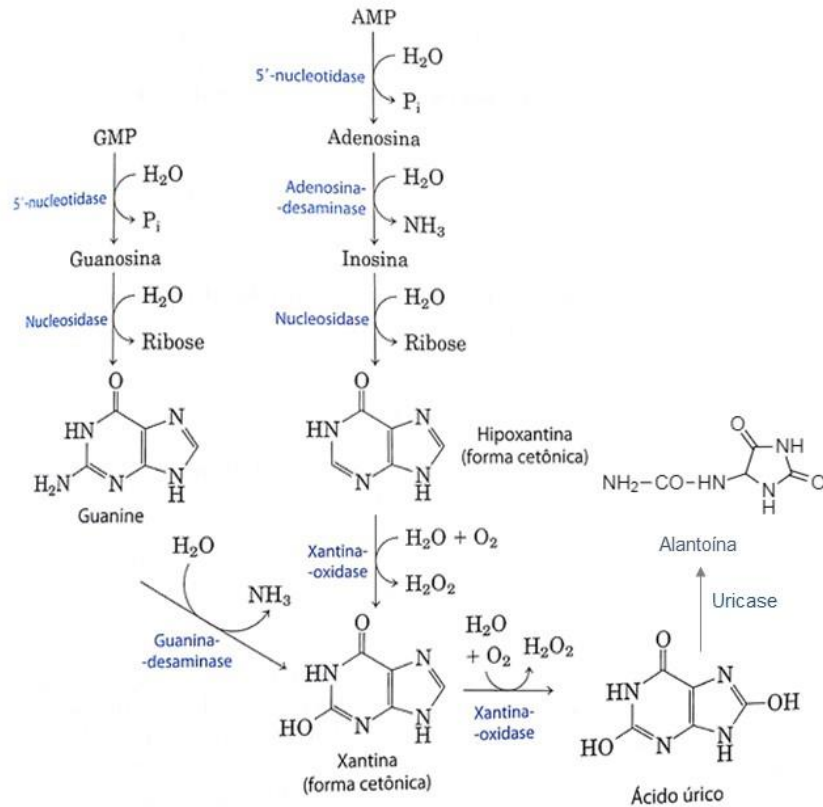


Figura 1: Rota do metabolismo das purinas (Adenina e Guanina). Fonte: Nelson e Cox, 2014, com adaptações.

A hiperuricemia é caracterizada por anormalidades nos sistemas enzimáticos de regulação do metabolismo de purinas ou diminuição da excreção de ácido úrico pelos rins, juntamente com a elevação de ácido úrico sérico superior a 6,8 mg/dl (Strilchuk et al., 2019).

Alguns fatores comportamentais são preponderantes para o desencadeamento da gota, sendo o estilo de vida de cada pessoa um dos principais fatores para o aumento das chances de adquiri-la. O primeiro deles é o alto índice de massa corpórea, pois esta influencia na baixa excreção de ácido úrico, juntamente com o aumento da produção de purinas provinda da dieta, proporcionando maiores riscos ao surgimento da hiperuricemia e gota. A ingestão de alimentos ricos em purinas, como peixes, frutos do mar e carnes vermelhas, associados à ingestão de gorduras saturadas, que são fontes de aumento da resistência insulínica em obesos, leva a redução renal de urato.

O segundo fator que predispõe a gota é a ingestão de bebidas alcoólicas, onde o risco em desenvolver gota, possui característica dose-dependente. O álcool age tanto na redução da excreção, quanto no aumento da produção do ácido úrico.

Os níveis de ácido úrico sérico podem ter relação com as doenças cardiovasculares, como a hipertensão e o risco de eventos coronarianos e também podem estar ligados ao desenvolvimento de doenças renais (Choi e Curhan, 2017; Park et al., 2014; Pasalic et al., 2012; Roddy e Choi, 2014; Zang et al., 2006).

Por fim, têm-se medicamentos que induzem ou diminuem a hiperuricemia. O salicilato, fenofibrato, losartana e bloqueadores de canais de cálcio, são medicamentos com efeitos hipouricêmicos, já os beta bloqueadores e tiazídicos elevam os níveis séricos de ácido úrico (Santos, 2016).

2.1.1 Inflamação

A Inflamação é uma resposta do organismo com o objetivo de protegê-lo de danos celulares causados por micro-organismos, agentes físicos e químicos, necrose tecidual, reações imunológicas, reações alérgicas, entre outras. (Lima et al., 2007; Orellano, 2015). Inicialmente, a resposta inflamatória é inespecífica, também chamada de resposta inata, pois ela independe do agente agressor. A sequência de eventos após a resposta inata dependerá do agente agressor e do tipo de tecido ou órgão atingido, o que levará a diferentes sintomas e diferentes formas de defesa, por isso então chamadas de resposta imune específica ou adaptativa (Coutinho et al., 2009).

O processo de resposta inflamatória inicia-se com o aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, edema e dor. Esses fatores estão relacionados com a migração de diferentes células imunológicas, que são coordenadas por moléculas pró e anti-inflamatórias, como prostaglandinas (PGs) e citocinas. As primeiras células a migrarem para o tecido lesado são os neutrófilos e mastócitos teciduais, com subsequente surgimento de diferentes células do sistema imune para o local da lesão, como linfócitos, células dendríticas, mastócitos, fibroblastos, entre outras. Juntamente a essa sequência de eventos desempenhadas pela resposta imune inata, está a reação adaptativa, que está relacionada especificamente a um determinado agressor, para dar suporte a reação imune inata, onde linfócitos migrarão para a área afetada e iniciarão o processo de produção de anticorpos. Dessa forma, o processo inflamatório inibe a proliferação do patógeno agressor e reestabelece o tecido (Coutinho et al., 2009; Lima et al., 2007; Orellano, 2015).

O processo inflamatório da artrite gostosa acontece na crise aguda desta patologia, onde os cristais de urato presentes nas articulações e tecidos moles se acumulam, e sofrem ação das células imunológicas que estão no líquido sinovial, como os macrófagos, que

agem fagocitando os cristais de ácido úrico. A partir de então são liberadas citocinas, tais como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que atuam aumentando a dilatação dos vasos sanguíneos e a permeabilidade celular, de modo que haja o recrutamento de outras células, sendo a principal delas os neutrófilos, que ao ingerirem cristais de ácido úrico (MSU) sofrem morte celular, com consequente liberação de enzimas lisossomais. Este processo de formação do inflamassoma de neutrófilos tem duração de sete dias, e está associado aos episódios de crise da gota (Lima, 2014). Além disso, o estresse oxidativo nas células de defesa do organismo também liberam diversos mediadores pró-inflamatórios no processo de inflamação nas articulações (Azevedo et al., 2017; Lima, 2014; Machado et al., 2009).

2.1.2 Estresse oxidativo

Em organismos aeróbicos é normal ocorrer produção de radicais livres, devido ao metabolismo do oxigênio e a alguns eventos patológicos, tendo como consequência a redução incompleta desse componente químico, e então a formação de radicais livres. Porém o grande problema está na produção excessiva desses radicais, que pode levar a um desequilíbrio entre a capacidade de defesa antioxidante do sistema e a produção dos radicais, causando efeitos nocivos ao sistema biológico. Esse desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo (Machado et al., 2009; Ferreira, 1997).

O sistema de defesa antioxidante é gerado para proteger as células do estresse oxidativo, e assim evitar que importantes células percam suas funções vitais. Dessa forma, o sistema imunológico possui duas vertentes de proteção, uma delas age antes de ocorrer a lesão, composta pelas seguintes substâncias: glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Já a segunda vertente tem como função reparar a lesão celular, e é composta pelo ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros.

O sistema antioxidante composto pela enzima hemeoproteica CAT, presente no citoplasma das células, tem como função dismutar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sendo essa reação dependente do NADPH, como ilustrado na **Figura 2** (Barreiros et. al, 2006; Ferreira et al., 1997).

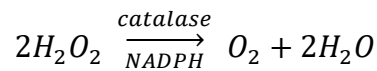


Figura 2: Dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Fonte: (Barreiros et. al, 2006)

Similar à CAT temos outra enzima antioxidante, chamada SOD, que também catalisa a dismutação de moléculas. Neste caso, a SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio na presença do próton H^+ (**Figura 3**). Ela pode estar presente em duas formas no organismo, ligada ao cobre e zinco (SOD-cobre-zinco) presente no citosol ou ao magnésio (SOD-magnésio), encontrada nas mitocôndrias (Barbior, 1997; Ferreira et. al, 1997).

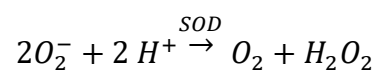


Figura 3: Dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Fonte: (Barbior, 1997).

O estresse oxidativo é um evento que também está relacionado a crise aguda da gota. Este ocorre quando no organismo há um desequilíbrio entre a oxidação de moléculas biológicas, decorrentes da ação de radicais livres e a proteção antioxidante proveniente do sistema de defesa. Dessa forma, o sistema imunológico atua sobre os radicais livres, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio produzindo IL-2. Essa interleucina é um importante fator na resposta imunológica e, conseqüentemente, na inflamação sendo responsável pela maturação, diferenciação e ativação das células T (Azevedo et al., 2017; Lima, 2014; Machado et al., 2009; Smith, 1988). Sendo assim, o estudo das moléculas antioxidantes é extremamente importante para elucidar o mecanismo do estresse oxidativo na inflamação.

2.1.3 Dor e nocicepção

O conceito sobre a dor surgiu pela primeira vez pela Associação Internacional para o Estudo da dor, em 1986, onde ela foi definida como uma percepção de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo (Iasp, 1986). Um evento doloroso tem como função, anunciar ao organismo sobre o risco de uma lesão, comportando-se como um mecanismo de proteção (Klaumann et al., 2008).

Já a percepção do estímulo está diretamente relacionada aos nociceptores, presentes em maior quantidade na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, que ao receber um estímulo sobre uma lesão ou um sinal doloroso, imediatamente faz uma transdução desse

sinal ao sistema nervoso central, de forma que o organismo reaja protegendo-se da dor ou lesão (Alves et al., 2017; Klaumann et al., 2008). Nociceptores são receptores sensitivos primários que se encontram na pele, órgãos e articulações (Ferreira, 2010; Alves, 2017).

O termo nocicepção e antinocicepção são usualmente empregados a animais, uma vez que eles não são capazes de verbalizar a dor, o que os difere dos humanos e, portanto, são correlacionados a eventos dolorosos como dor e analgesia, respectivamente (Jones, 1992).

A dor nociceptiva ocorre quando há ativação direta dos nociceptores devido a um estímulo térmico, mecânico ou químico (Sherrington, 1906).

O processo doloroso se inicia com a transformação de um estímulo agressor em potenciais de ação (Rocha et al., 2007). O estímulo lesivo ativa os nociceptores presentes nas terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C, sendo a primeira mielinizada e, portanto, sua transmissão de sinal doloroso se faz de forma mais rápida, já que o nociceptor C não é mielinizado, fazendo dele um transdutor de sinal lento. As fibras C estão relacionadas aos nociceptores que agem através de estímulos químicos, térmicos e mecânicos e as fibras A δ estão associadas a mecanoreceptores (Meyer et al., 1994). Essas fibras nervosas periféricas transferem sinais para o sistema nervoso central (Rocha et al., 2007). O estímulo agressor é traduzido em sinais elétricos, passando pelo corno dorsal da medula espinhal e centros supraespinhais que serão transmitidos ao sistema nervoso central, onde na região do córtex cerebral será interpretado como dor (Besson & Chaouch, 1987).

As fibras nociceptivas A δ e C possuem subtipos que estão relacionados com alterações periféricas, sendo classificadas com A δ 1, A δ 2, C1 e C2 (Neto, 2009).

A dor inflamatória está diretamente relacionada a sensibilização de nociceptores periféricos, que compõem as fibras nervosas aferentes primárias (fibras nociceptivas A δ e C), na presença de estímulos ocasionados por mediadores pró-inflamatórios ou a algum evento estimulador pró-nociceptivo, alguns deles demonstrados na **tabela 1** (Fattori, 2016).

A transdução de sinal dos nociceptores se inicia por meio de sua sensibilização ocasionada a partir de alguns estímulos nocivos, o estímulo nocivo pode ser térmico, mecânico ou químico. Como exemplo desses estímulos temos respectivamente, variação de temperatura, diferença de pressão osmótica nas células ou estiramento do tecido, ausência de oxigênio no sangue para manter as funções vitais ou dano tecidual seguido de inflamação. Além dos nociceptores ativos existe o nociceptor silencioso, o qual não responde a estímulos, à exceção de ações de mediadores inflamatórios ou em resposta a um agente agressor. Dessa forma, os nociceptores silenciosos, também chamados de

“silent”, só são sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais após a ação destes mediadores, que podem ser cininas, bradicininas, histamina, hidrogênio, potássio, citocinas, entre outros (Ferreira, 2010; Alves, 2017).

Normalmente os nociceptores de dor são ativados pela ação de substâncias químicas presentes no organismo, como a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, TNF- α , fator de crescimento nervoso, e AMPc (Bedbook, 1976; Piotrowisk et al., 1986).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas após um estímulo lesivo com consequente inflamação e estes têm um papel essencial na continuidade da dor inflamatória, pois quando recrutados liberam citocinas pró inflamatórias, dentre elas, IL-1 β , TNF- α e IL-33 (Verri et al., 2006). Após danos a tecidos ou células, uma sequência de citocinas pró-inflamatórias ativam a liberação de aminas simpáticas e PGE₂ que fazem a excitação dos nociceptores, sensibilizando-os (Zarpelon et al., 2013). Citocinas frequentemente agem em efeito cascata, ou seja, citocinas estimulam uma célula alvo a produzirem mais citocinas (Oliveira et al., 2011). Dessa forma, a citocina IL-33, que faz parte da família das citocinas IL-1, inicia uma cascata, na qual é estimulada a produção de TNF- α , em sequência IL-6, IL-1 β e PGE₂. Além disso, a sequência de produção de TNF- α , CXCL1, IL-1 β e aminas simpáticas também é estimulada (Zarpelon et al., 2013). Os produtos finais como a PGE₂ e as aminas simpáticas são considerados mediadores finais da dor inflamatória, devido ao fato das células neuronais possuírem receptores específicos para PGs e, assim, elas sensibilizam diretamente os nociceptores (Neto., 2009). Conforme os mediadores finais (PGE₂ e aminas simpáticas) se ligarem aos seus receptores, são ativadas a liberação de proteínas quinases, como a PKA e a PKC, que irão fosforilar canais iônicos (TRPV1, TRPA1 e Nav1.8) ativando os nociceptores (Fattori., 2016).

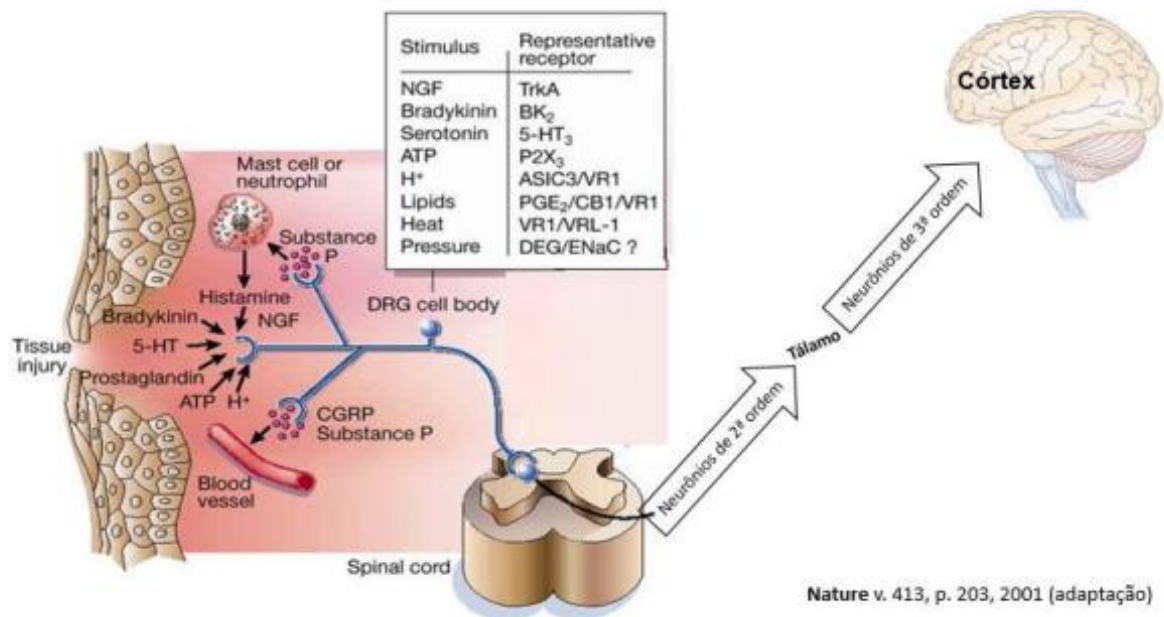


Figura 4: Representação esquemática da via ascendente da dor. Fonte: Silveira, 2014.

Existem também outros mediadores liberados por neutrófilos que levam a hipernocicepção, são eles a endotelina (Verri et al., 2009; Zarpelon et al., 2013; Zarpelon et al., 2012), LTB₄ (Guerrero et al., 2008), proteína do complemento C5a (Ting et al., 2008), e espécies reativas de oxigênio (EROS), sendo a principal delas o ânion superóxido (Janes et al., 2012; Miole et al., 2015; Wang et al., 2004).

A dor crônica nos anos 2000, passou a ser relatada também como dor neuropática, sendo utilizada para descrever dores de origem neural, conseqüentemente designando uma patologia do sistema nervoso. Essa dor é gerada devido a lesões que acometem o sistema nervoso, resultante de doenças do tipo autoimune, doenças metabólicas, infecção, doença de origem vascular, traumas e câncer (Silveira, 2014). A dor neuropática é desencadeada através das vias nociceptivas, onde os nociceptores são capazes de enviar impulsos elétricos propagáveis pelas células excitáveis, que chegam a cadeia de gânglios simpáticos paravertebrais (paralela aos gânglios de raiz dorsal). O aumento do tônus simpático e de inervações simpáticas, alterações na sensibilidade de canais iônicos e excitabilidade neural, ocorrem nos neurônios dos gânglios de raiz dorsal (DRG), para desencadear o processo de dor neuropática (Pertovaara, 2013).

Tabela 1. Principais mediadores e estímulos pró-nociceptivos e seus receptores.

<i>Mediador/Estímulo</i>	<i>Receptor</i>
IL-1 β	IL-1R
TNF- α	TNFR
Bradicinina	B1 e B2
LTB4	BLT1 e BLT2
PGE2	EP3
ATP	P2X2, P2X3 e P2X7
C5a	C5aR
Endotelina-1	ETA e ETB
Calor / pH baixo	TRPV1
Mecânico / Irritantes	TRPA1
Frio	TRPM8
Frio	Nav1.8
pH baixo	ASIC

Fonte: Fattori., 2016; Braz et al., 2014; Burnstock et al., 2009; Guerrero et al., 2008; Mogil et al., 2000; Nakamura et al., 1987; Scholz et al., 2002; Verri et al., 2006; Woolf et al., 2000

2.1.4 Citocinas

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis que atuam em células vizinhas, por mecanismo parácrino, também em suas células produtoras (mecanismo autócrino) e de forma endócrina, em células distantes (Varella e Forte, 2001). As citocinas são produzidas por diferentes tipos de células quando ocorre uma lesão. Uma mesma citocina pode induzir uma célula a produzir outra citocina, sendo assim, realizado o efeito cascata e, desse modo, elas podem regular tanto a produção de outras citocinas, quanto sua atividade. Como exemplo, elas podem aumentar a resposta de um processo inflamatório, agindo como citocina pró-inflamatória ou até mesmo diminuir essa resposta, agindo como anti-inflamatória. Elas também podem atuar na transcrição gênica de células imunológicas, de forma a influenciar na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas (Oliveira et al., 2011).

Existem células no sistema tissular que são fundamentais para a produção da interleucina do tipo IL-1, sendo monócitos e macrófagos a principal fonte de IL-1 β , já os queratinócitos produzem a IL-1 α . Há outros tipos de células que também produzem IL-1, sendo elas células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T. Outras citocinas e patógenos também podem induzir a produção de IL-1, como o TNF-

α , Interferon α (IFN- α), β , gama, lipopolissacarídeos (LPS), vírus e antígenos (Arend, 1991; Varella e Forte, 2001).

A IL-1 β , desempenha muitas funções no organismo, podendo destacar sua ação no hipotálamo, agindo como pirógeno endógeno, ou seja, que estimula a produção de PGE2. A IL-1 β ainda pode regular sua própria síntese, inibindo sua produção por meio da estimulação da hipófise posterior, que irá produzir o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Este agirá na hipófise anterior para a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que de forma sequencial vai estimular a região fasciculada do córtex da adrenal, gerando corticosteroides para inibir a síntese primária de IL-1. Além disso, a IL-1 β ainda causa a hiperglicemia em pacientes diabéticos com processo infeccioso e aumentam a atividade de osteoclastos e adipócitos (Rothewell, 1991; Varella e Forte, 2001).

Em 1975 o TNF foi estudado e designado como um fator presente no soro capaz de necrosar as células tumorais (Carswell et al., 1975; Junior, 2008). A produção do fator de necrose tumoral, TNF- α , é estimulada por alguns fatores, como Interferon (INF), IL-1, IL-2, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e fator ativador de plaquetas (PAF). Esta citocina é produzida, principalmente, por macrófagos, porém sintetizada também por monócitos, neutrófilos, células T e NK, após estimulação por LPS (Tracey e Cerami, 1993).

O TNF pode ser classificado de três formas, o tipo TNF, a linfotoxina (LT) α e a LT β . Elas podem tanto estar solúvel no soro, como ligado a membrana das células, sendo que a forma solúvel só é secretada, após ações enzimáticas da TACE (*TNF-alfa-converting enzyme*), que é seu precursor ligado à membrana, dessa forma o TNF é clivado e liberado (Tracey et al., 2008; Junior, 2008).

Existem receptores que são específicos para o TNF- α , chamados de TNF-R I e II, que ao se ligarem podem ativar uma proteína com função apoptótica, dessa forma o TNF α pode desempenhar a proliferação da célula, com a expressão do gene ou seguir para a morte celular ou até mesmo agir das duas formas (Barbosa et al., 2018; Abbas et al., 2015).

Tanto a IL-1 β como o TNF- α , são importantes mediadores na dor inflamatória, e no processo inflamatório da artrite gotosa.

3. TRATAMENTO DA GOTA

O tratamento da artrite gotosa possui duas vertentes, uma voltada para tratar a crise aguda e outra utilizada como terapia a longo prazo. A primeira etapa se deve ao controle da inflamação, alívio da dor e diminuição da incapacitação articular que são comuns na crise aguda. Já na segunda etapa utiliza-se de métodos e fármacos que previnem as crises agudas e que diminuem as concentrações de ácido úrico no sangue e, conseqüentemente, nas articulações (Azevedo et al., 2017).

Para tratar a inflamação decorrente da gota aguda utiliza-se como primeira escolha os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que atuam inibindo as cicloxigenases (COX 1 ou COX 2), as quais catalisam a formação de PGS a partir do ácido araquidônico. Como exemplo tem-se a indometacina, naproxeno, ibuprofeno, aspirina e celecoxibe, que dependendo da intensidade da crise, podem ser administrados em doses elevadas. Os dois primeiros fármacos citados possuem uso tradicional, porém tais substâncias dispõem de efeitos adversos, como toxicidade gastrointestinal e renal, além de possibilitar sangramento gastrintestinal (Azevedo et al., 2017; Lima, 2014).

Em casos de crise aguda também pode-se utilizar a colchicina, um agente anti-inflamatório, com função antimitótica e com um estreito índice terapêutico, ou seja, sua dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica, sendo assim, pode ocasionar vômitos, diarreia e dor abdominal, além de vários outros efeitos menos prevalentes e mais sérios, como hepatite, supressão da medula óssea, neuropatia e insuficiência cardíaca (RDC 232, 2005). Já nos casos de hipersensibilidade aos AINES ou a colchicina é recomendado a corticoterapia por via intra-articular ou sistêmica (Mediavilla e Miguel, 2011).

O fármaco canakinumabe é um anticorpo monoclonal anti IL-1, que apesar de ser menos comum, também pode ser utilizado em alguns casos de crise inflamatória da gota (Azevedo et al., 2017).

Para o tratamento de casos crônicos de gota são usados os inibidores da enzima xantina oxidase, responsável pela síntese do ácido úrico. Existem dois fármacos disponíveis no mercado e muito utilizados para essa funcionalidade, o alopurinol e o febuxostate. Tendo o primeiro 90% de efetividade no tratamento da redução de ácido úrico sérico entre os pacientes, e ainda considerado um medicamento relativamente seguro e financeiramente acessível. O alopurinol possui como principal metabólito ativo, o oxipurinol e os dois inibidores competitivos não específicos das enzimas hipoxantina oxidase e xantina oxidase, respectivamente. Essas duas enzimas fazem parte da síntese do ácido úrico, desta forma esses dois fármacos diminuem a produção de uratos. Porém o oxipurinol

corresponde a 90% da biodisponibilidade do alopurinol e sua principal fonte de excreção é renal.

Já o febuxostate tem seu metabolismo essencialmente hepático, sendo mínima a sua quantidade excretada pelos rins, demonstrando ser um fármaco com grande potencial como primeira opção para pacientes com doenças renais. Além disso, ele é um inibidor altamente específico da xantina oxidase, inibindo-a tanto na forma reduzida quanto oxidada, por bloqueio competitivo ou não competitivo (**Figura 5**) (Azevedo et al., 2017; Choi et al., 2004).

Em comparação com o alopurinol, o febuxostate dispensa ajustes de doses e também possui menos interações medicamentosas, o que faz dele um fármaco mais eficaz e seguro. Porém ele não está livre de efeitos adversos, pois seu uso está relacionado com alterações na função hepática e em alguns casos observou-se efeitos adversos cardiovasculares, o que limita o seu uso em pacientes com insuficiência cardíaca. Outro detalhe é que a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) ainda não liberou a entrada do febuxostate no Brasil e seu alto custo dificulta o uso deste medicamento no país (Azevedo et al., 2017).

Apesar do alopurinol ser um medicamento efetivo em reduzir os níveis de ácido úrico no sangue, ele possui muitos efeitos adversos como reações alérgicas, erupções cutâneas, hepatite, febre e nefropatia (McInnes et al., 1981; Kong et al., 2000).

Por fim, temos os fármacos uricosúricos probenecida, benzbromarona e sulfipirazona, que agem inibindo a proteína transportadora trocador de ânion urato renal 1 (URAT 1) no túbulo contorcido proximal do rim, de forma a impedir a reabsorção de urato, levando a uma maior excreção de ácido úrico na urina. Em 2003, a benzbromarona foi proibida em alguns continentes devido a grave toxicidade causada no fígado e supressão medular óssea.

Os agentes uricosúricos são medicamentos utilizados como segunda opção no tratamento da gota, pois como primeira opção sempre é indicado um hipouricemiante, como os inibidores de xantina oxidase. Além disso, há grande propensão à formação de cálculos renais, porque esses medicamentos aumentam a concentração de uratos nos ductos coletores dos rins. Alguns outros medicamentos também já apresentaram moderada atividade uricosúrica, como losartana e fenofibrato (Azevedo et al., 2017; Mediavilla e Miguel, 2011).

Outra opção para a terapêutica da gota é o lesinurade, medicamento desenvolvido para tratar o HIV, por inibir a enzima transcriptase reversa. Este se mostrou como um promissor uricosúrico, porém ainda está em estágio de aprovação para este fim (Bach e Simkin, 2014).

Dentre todos os fármacos uricosúricos citados, alguns deles ainda não são liberados para uso no Brasil, como o febuxostate e sulfipirazona demonstrados na **tabela 2**, assim como o canaquinumabe, medicamento anti-inflamatório, e Pegloticase, medicamento hipouricêmico, utilizados no tratamento da gota em outros países.

Tabela 2: Situação dos medicamentos para tratamento da gota de acordo com as agências reguladoras ANVISA, FDA e EMA. Fonte: Azevedo et al. (2017).

<i>Medicamento</i>	<i>Agência Reguladora</i>		
	ANVISA	FDA	EMA
<i>AINES</i>	Liberado	Liberado	Liberado
<i>Colchicina</i>	Liberado	Liberado	Liberado
<i>Corticosteróides</i>	Liberado	Liberado	Liberado
<i>Canaquinumabe</i>	Não liberado	Liberado	Liberado
<i>Alopurinol</i>	Liberado	Liberado	Liberado
<i>Febuxostate</i>	Não liberado	Liberado	Liberado
<i>Probenecida</i>	Liberado	Liberado	Liberado
<i>Benzbromaroma</i>	Liberado	Não liberado	Não liberado
<i>Sulfipirazona</i>	Não liberado	Liberado	Liberado
<i>Pegloticase</i>	Não liberado	Liberado	Liberado

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil); EMA, *Euro-pean Medicines Agency* (Europa); FDA, *Food and Drug Administration* (EUA).

Há espécies animais que não originam urato como produto final do metabolismo de purinas, em seu lugar produzem alantoína, um composto mais solúvel e fácil de ser excretado. Porém, o ácido úrico é um antecessor a esse produto de excreção e pela ação da enzima uricase, ele é convertido a alantoína. A pegloticase é uma enzima que atua de maneira semelhante à uricase e aparece como uma opção para reduzir a concentração de ácido úrico circulante (Wu et al., 1992). No entanto, todas as terapêuticas descritas acima possuem limitações e a busca por novas opções para o tratamento da hiperuricemia e gota são necessárias.

Na **figura 5** encontram-se ilustrados mecanismo de ação e vias de excreção dos principais fármacos citados nesse tópico.

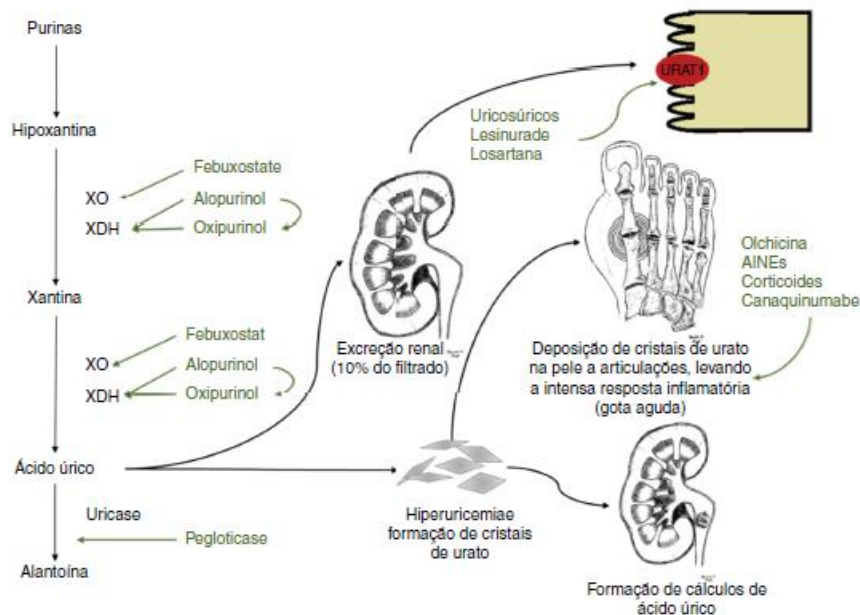


Figura 5: Medicamentos e suas vias de ação para o tratamento da Gota. Fonte: Revista Brasileira de Reumatologia, 2017.

3.1 Gênero *Lychnophora*

As *Lychnophoras* são espécies nativas do Brasil, pertencentes à família *Asteraceae* e popularmente denominadas “arnica”, “falsa arnica”, “candeia”, “arnica brasileira”, “arnica mineira” ou “arnica da serra” (Cerqueira et al., 1987). As partes aéreas das *Lychnophoras* são administradas na forma de soluções alcoólicas e hidroalcoólicas com finalidades de aliviar a dor, tratar a inflamação e reumatismo, e são utilizadas também na cicatrização do processo de restabelecimento cutâneo em casos de picadas de inseto (Cerqueira et al., 1987; Grandi et al., 1989; Saúde et al., 1998).

Diversos metabólitos foram identificados no gênero *Lychnophora* por meio de estudos fitoquímicos, sendo eles: triterpenóides, sesquiterpenóides (cariofileno, α -humuleno e seus derivados), flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, açúcares, taninos, esteroides, lignanas, poliacetilenos, fenilpropanóides (ácidos cafeoilquínicos), ácidos graxos de cadeia longa e seus ésteres (Bazon et al., 1997; Bohlmann et al., 1981; Bohlmann e Jakupovic, 1990, Borella et al., 1998; Borsato et al., 2000; Cunha, 1994; Grael et al., 2005; Gobbo-Neto et al., 2008; Jordão, 2003; Santos et al., 2005; Saúde et al., 1998; Silveira et al., 2005).

Os flavonoides são importantes constituintes químicos presentes nas *Lychnophoras* e são responsáveis por atividades, tais como, antioxidantes, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, hormonal e sobre a permeabilidade capilar (Harbone e Williams, 2000).

A quercetina, um flavonoide muito encontrado nas *Lychnophoras*, demonstrou atividade anti-inflamatória pronunciada em testes de aplicação transdermal via fonforese,

após 72 horas da sua administração em patas de ratos. As patas destes animais foram submetidas à lesão muscular e, em seguida, estas foram tratadas com ultrassom terapêutico, usando um gel incorporado com a quercetina. Os dados foram analisados observando o aspecto histológico das fibras musculares e, dessa forma, concluiu-se que não houve degeneração, mas foi observado leve edema nos músculos lesionados (Abreu et al., 2013). O triterpeno lupeol e o esteroide estigmasterol também apresentaram atividade similar a quercetina neste mesmo teste, agindo como compostos anti-inflamatórios (Guzzo et al., 1996; Silva, 2016).

A tribo *Vernoniaeae*, possui sete gêneros, que tem como característica a presença de derivados da *p*-hidroxiacetofenona, dentre eles encontram-se as *Lychnophoras* que apresentam como metabólito secundário de maior prevalência e de interesse biológico, as lactonas sesquiterpênicas (Borella et al., 1998). Estas são constituintes com variada atividade biológica tais como antitumoral (Lee et al., 1977; Saúde-Guimarães et al., 2014), antibacteriana (Giesbrecht et al., 1990; Saúde-Guimarães, 2002), antimalárica (François et al., 1996), tripanossomicida (Chiari e Oliveira, 1991, Oliveira et al., 1996), esquistossomicida (Vichnewski et al., 1976), anti-inflamatória (Abad et al., 1994; Ferrari et al., 2013) e cardiotônica (Robles et al., 1995). Estas atividades têm sido relacionadas à presença do grupo α -metileno- γ -lactona na estrutura química das lactonas sesquiterpênicas (Rodriguez et al., 1976).

Seguindo a tradição milenar, as *Lychnophoras* são grandes candidatas a tratamento de doenças inflamatórias, como a gota. Dados relatados por Bernardes e colaboradores (2019), demonstraram que as lactonas sesquiterpênicas, goiazensolida isolada da espécie *Lychnophora passerina* e eremanolida C e licnofolida, obtidas de *L. trichocarpha*, apresentaram atividade anti-hiperuricêmica em ratos Wistar, tanto pelo mecanismo de inibição da xantina oxidase, quanto pela ação uricosúrica, podendo agir por apenas um dos mecanismos ou pelos dois concomitantemente, diferindo apenas na dose administrada (Bernardes et al., 2019). Goiazensolida e licnofolida mostraram efeito uricosúrico na dose de 5 mg/kg. Já goiazensolida e licnofolida, na dose de 10 mg/kg, e eremanolida C, nas doses de 5 e 10 mg/kg, apresentaram ambos efeitos, de inibição da xantina oxidase hepática e uricosúrico (Bernardes et al., 2019).

3.1.1 *Lychnophora pinaster* Mart.

Lychnophora pinaster Mart. é comumente encontrada em ambientes áridos, onde há escassez de água e uma intensa incidência de luz solar. Nestes locais elas encontram-se

apoiadas em blocos de rochas ou em topos de pequenos morros, típicos de campos de canga ou campos ruprestes (Semir, 1991).

A sua floração ocorre na mudança do clima seco para o chuvoso, onde as primeiras chuvas e o aumento da temperatura servem de estímulo para o brotamento de flores. Esse momento ocorre entre os meses de agosto e outubro de todos os anos e permanece durante 8 semanas. Passada a floração, instala-se a fase de frutificação, que se inicia nos meses de dezembro e perduram até o mês de fevereiro. Após essas fases as *lychnophoras* permanece com suas folhas verdes durante todo o ano (Semir, 1991).



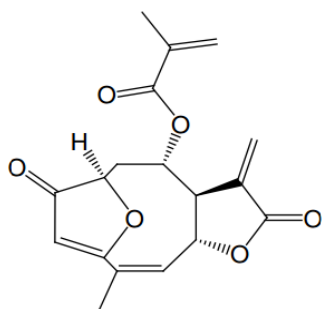
*Fotos: Paulo Sérgio Siberti da Silva (2012).

Figura 6: *Lychnophora pinaster*, indivíduo jovem (A) e indivíduo adulto (B). Fonte: Silva, 2016.

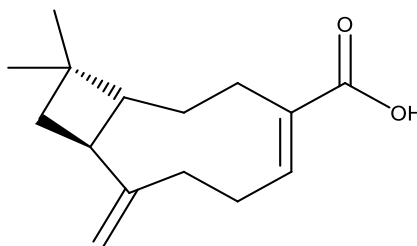
Os constituintes fitoquímicos do extrato hexânico e etanólico das partes aéreas de *L. pinaster* já foram elucidados por meio de estudos precedentes e dentre eles estão presentes a lactona sesquiterpênica 15- desoxigoiazensolida, o sesquiterpenóide ácido *E*-licnofórico, os ácidos fenólicos clorogênico e cafeico, o ácido cinâmico, os flavonoides quercetina, rutina, pinobanksina, isovitexina e vitexina, os triterpenos lupeol e friedelina, uma mistura dos triterpenos α e β -amirina, uma diversificada composição de ésteres de ácido graxo e hidrocarbonetos saturados (Alcântara et al., 2005; Duarte, 1993; Duarte, 1999; Ferreira et al., 2005; Ferreira, 2010; Silveira et al., 2005). Além desses compostos, Abreu (2009) isolou e caracterizou fitoconstituintes da *Lychnophora pinaster*, encontrando diversos hidrocarbonetos alifáticos de C14 a C16, derivados do pseudotaraxasterol, uma mistura de 3-*O*-acetil-urs-12-eno, 2-nonadecanona, 2-pentacosanona, 4,4-dimetil-cholesta-22-24- dien-5-ol, éster metílico derivado da *O*-alquil- α -amirina, hidrocarbonetos alifáticos, acetato de baurenila, mistura de estigmasterol e β -sitosterol.

Em estudos prévios realizados com os extratos hexânico e etanólico de *Lychnophora pinaster* obteve-se o isolamento do ácido *E*-licnofórico, quercetina, 15-desoxigoiazensolida, lupeol, fridelano, uma mistura de α e β -amirina, uma mistura de ésteres de ácido graxo e hidrocarbonetos saturados (Silveira et al., 2005; Ferreira, 2010).

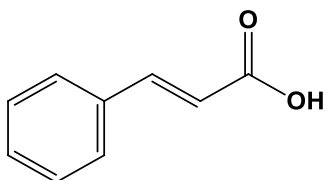
No óleo essencial da espécie *L. pinaster* foram indentificados dois sesquiterpenos importantes para a atividade anti-inflamatória, o *E*-cariofileno e α -humuleno. Além dos monoterpenos α -pineno e β -pineno e do fenilpropanóide *E*-cinamato de metila, que conferiram ao óleo essencial atividade antimicrobiana (Silva, 2016).



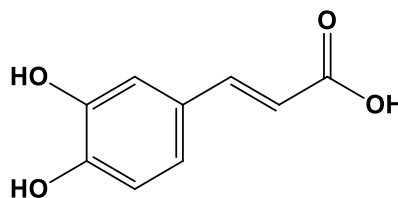
15-desoxigoiazensolida



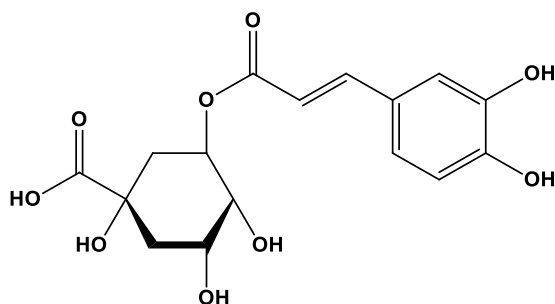
Ácido *E*-licnofórico



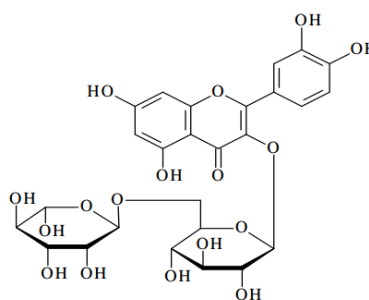
Ácido cinâmico



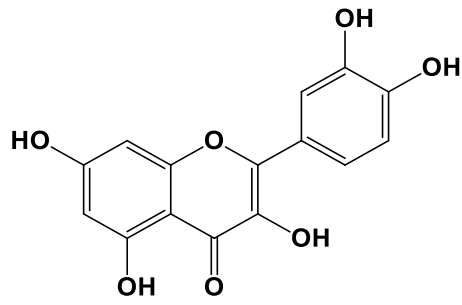
Ácido cafeico



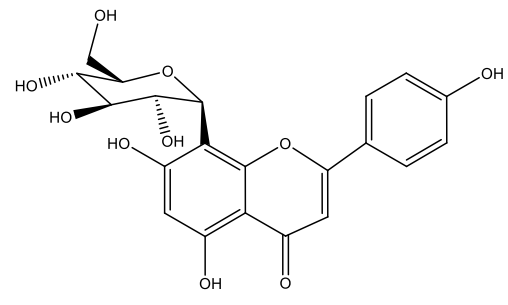
Ácido clorogênico



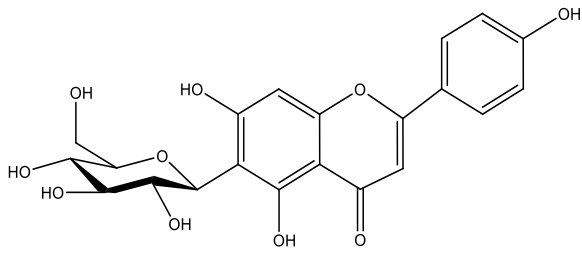
Rutina



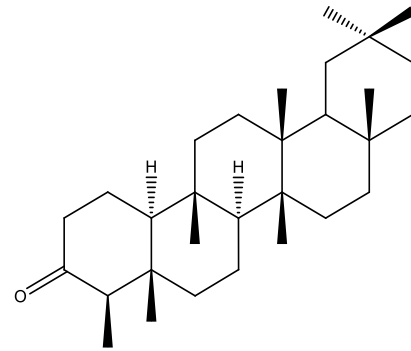
Quercetina



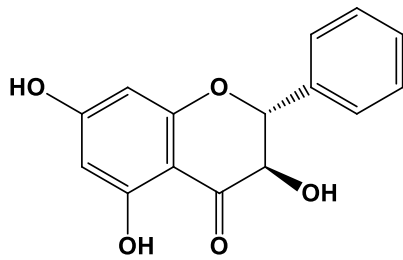
Vitexina



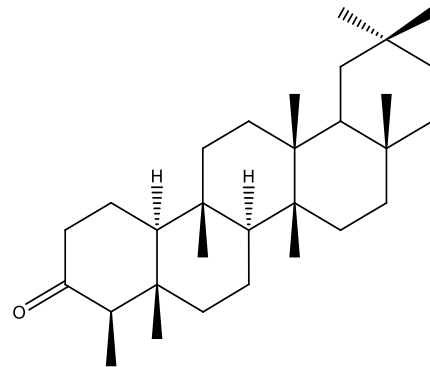
Isovitexina



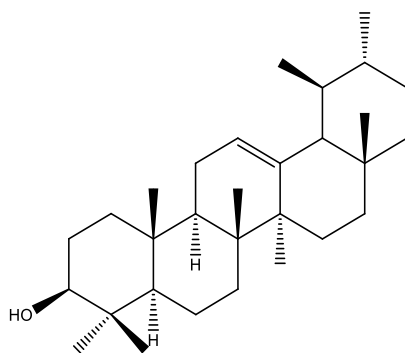
Friedelina



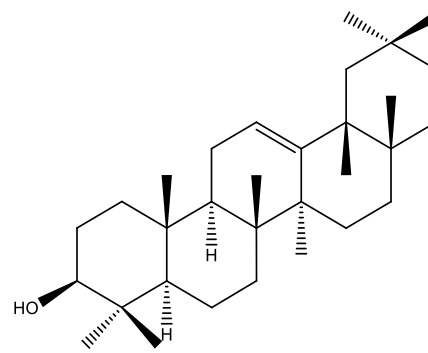
Pinobanksina



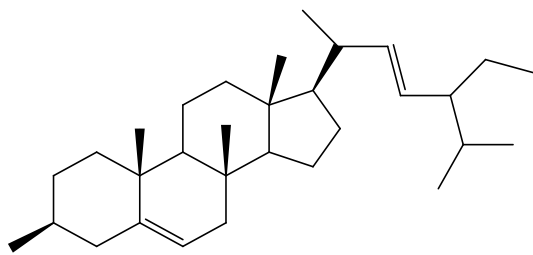
Friedelina



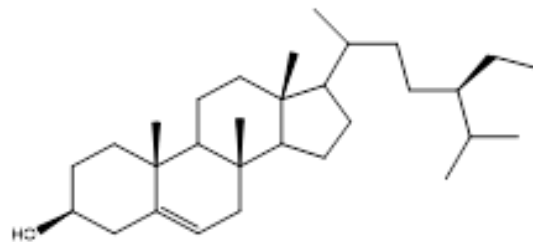
α-amirina



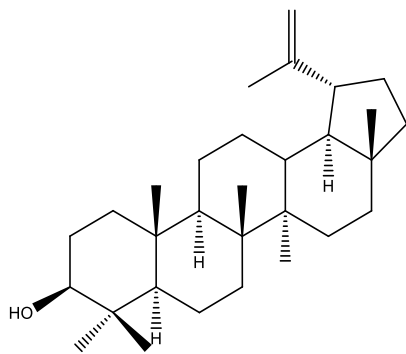
β-amirina



Estigmasterol



β-Sitosterol



Lupeol

3.1.2 Descrição botânica

A descrição botânica de *Lychnophora pinaster* Mart. pode ser encontrada integralmente em Semir e colaboradores (2011) (Semir et al., 2011).

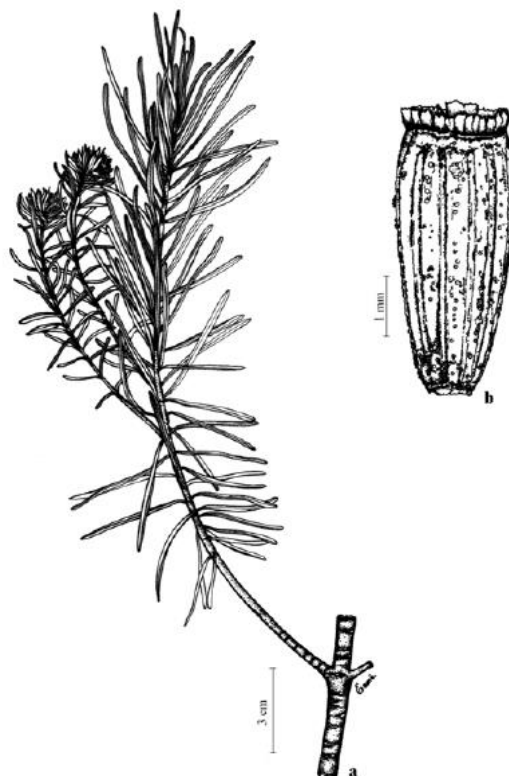


Figura 7: *L. pinaster*, a – ramo ; b – cápsula. Fonte: Souza et al. (2011).

A espécie *L. pinaster* e *L. ericoides* são plantas com características muito similares, portanto, difíceis de serem identificadas e muitas vezes são confundidas, porém há características muito sutis que determinam essa diferenciação. Os caracteres para diferenciá-las são: hábito, indumento e atributos foliares. Quando comparado o hábito entre essas duas espécies, a *L. ericoides* possui as características dos seus ramos mais robustas e normalmente com maiores dimensões, em contrapartida a *L. pinaster* tem uma aparência mais delicada e suas dimensões menores, apesar disso em alguns casos a morfologia de seus indivíduos pode apresentar-se de forma análoga a *L. ericoides* (Souza et al., 2011).

3.1.3 Atividades farmacológicas de *Lychnophora pinaster* e de seus componentes químicos

A atividade tripanossomicida dos extratos etanólico e aquoso liofilizado da *L. pinaster* e do ácido *E*-licnofórico foi comprovada em bioensaios (Oliveira et al., 1996; Silva, 2016). Em seguida foi constatada a mesma atividade para 15-desoxigoiasensolida, lactona sesquiterpênica isolada do extrato etanólico (Silva, 2016). No extrato aquoso identificou-se as seguintes substâncias fenólicas: ácido cafeico, vitexina, isovitexina, quercetina e ácido isoclorogênico, que também possuem atividade tripanossomicida (Silva, 2016).

Em estudos realizados por Guzzo, et al., (2008), o extrato etanólico da *L. pinaster* demonstrou atividade anti-inflamatória tópica no modelo de edema de pata induzido por carragenina, e antinociceptiva, nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e placa quente.

A atividade anti-inflamatória dos extratos e de compostos isolados de *L. pinaster* foi comprovada em testes de aplicação transdermal via fonoforese em patas de rato com significativa degeneração das fibras musculares. Nesse estudo o extrato hexânico se mostrou moderadamente efetivo e o extrato aquoso reduziu com alta eficácia, quando comparados com o fármaco anti-inflamatório padrão, dexametasona (Silva, 2016). Seguindo o mesmo experimento, quando testados nos compostos isolados do extrato hexânico da planta, o flavonoide quercetina, o triterpeno lupeol, uma mistura de α -amirina e lupeol e a mistura dos esteróides estigmasterol e sitosterol, também mostraram ação anti-inflamatória (Silva, 2016).

Estudo realizado por Müller, (2017), demonstrou que tratamentos de camundongos Swiss com o extrato etanólico de *Lychnophora pinaster*, nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, reduziram os níveis séricos de ácido úrico. Os componentes químicos majoritários do

extrato (ácido cinâmico, rutina, quercetina, vitexina, lupeol, estigmasterol, ácido cafeico, ácido clorogênico, e ácido *E*-licnofórico), na dose de 15 mg/kg, também apresentaram efeito anti-hiperuricêmico. Tanto o extrato como as substâncias exerceram o efeito hipouricêmico pela inibição da atividade da xantina oxidase hepática. O extrato e seus componentes principais foram avaliados sobre o edema de pata induzido por monourato de sódio (MSU) em camundongos Swiss. O extrato e seus componentes químicos, com exceção da quercetina e da rutina, promoveram efeito antiedematogênico. As atividades anti-hiperuricêmica e anti-inflamatória apresentadas pelo extrato e pelo ácido *E*-licnofórico se assemelharam aos obtidos para alopurinol (inibidor da xantina oxidase) e indometacina, fármacos usados na clínica da gota e inflamação, respectivamente (Martins de Sá Müller et al., 2019).

Segundo Ferreira, (2019), na avaliação do efeito tópico do extrato etanólico de *L. pinaster* e de suas frações hexânica, diclorometânica, acetato etílica e metanólica no edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss, os tratamentos foram capazes de reduzir o edema na terceira hora após sua indução. Neste mesmo trabalho, o extrato etanólico de *L. pinaster* e de suas frações apresentaram efeito antinociceptivo nos métodos de placa quente e de contorções induzidas pelo ácido acético. O extrato e suas frações foram administrados, por via oral, na dose de 100 mg/kg. Indometacina e morfina foram utilizadas como fármacos de referência para o teste de contorções induzidas por ácido acético, e da placa quente, respectivamente. No método de placa quente, o extrato etanólico e as frações acetato etílica e metanólica mostraram efeito semelhante a morfina (Ferreira et al., 2019).

De acordo com os relatos de uso popular e os dados de atividades farmacológicas previamente apresentados, a espécie *L. pinaster* se mostrou promissora para a realização de estudos e pesquisas de novos fármacos e fitoterápicos para o tratamento da inflamação e gota.

As atividades farmacológicas descritas para os principais constituintes químicos de *L. pinaster* encontram-se resumidas na **tabela 3**.

Tabela 3: Atividades farmacológicas descritas na literatura para as principais substâncias encontradas em *L. pinaster*. Fonte: Silva, 2016, com adaptações.

Substância	Extrato	Parte da Planta	Atividade Farmacológicas	Referência
15-desoxi-goiazensolido	etanólico	partes aéreas	tripanossomicida; antibacteriana; anti-hiperuricêmica	Duarte et al.(1993) Chiari et al. (1991) Keles et al.(2011) Bernardes et al.(2019)
ácido cafeico ácido isoclorogênico vitexina isovitexina	aquoso	partes aéreas	tripanossomicida; anti-hiperuricêmica; anti-inflamatória;	Silveira et al. (2005a); Müller (2017) Barros (2019)
ácido <i>E</i> -lichnofórico	hexânico	partes aéreas	tripanossomicida; anti-hiperuricêmica; anti-inflamatória; antioxidante	Oliveira et al. (1996) Alcântara et al. (2005) Müller (2017) Barros (2019)
α -amirina lupeol estigmasterol sitosterol	hexânico/etanólico hexânico/etanólico hexânico/etanólico hexânico/etanólico	partes aéreas	antibacteriana; anti-inflamatória; anti-hiperuricêmica; antinociceptiva	Abreu et al. (2011) Abreu et al. (2013) Souza et al. (2012) Ferraz-Filha et al. (2016) Barros (2019)
quercetina	aquoso	partes aéreas	antibacteriana; anti-inflamatória; antinociceptiva	Abreu et al. (2011) Abreu et al. (2013)
friedelina	hexânico/etanólico	partes aéreas	anti-inflamatória; analgésica; antipirética	Silveira et al. (2005a) Antonisamy et al. (2011)

4. OBJETIVOS

4.1 Gerais

Avaliar os efeitos do extrato etanólico de partes aéreas de *L. pinaster* e de seus constituintes químicos principais sobre artrite gotosa e estresse oxidativo *in vivo*.

4.2 Específicos

- Avaliar o efeito do extrato etanólico de *L. pinaster* e de seus componentes majoritários sobre a nocicepção, migração de neutrófilos e sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 com artrite gotosa induzida por cristais de monourato de sódio (MSU).

- Avaliar o efeito do extrato etanólico de *L. pinaster* e de seus componentes majoritários sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido periarticular da região fêmur-tibial de camundongos C57BL/6 com artrite gotosa induzida por MSU.

5. JUSTIFICATIVA

A gota é uma doença associada à hiperuricemia, que ocorre pela deposição de MSU nas articulações e tecidos. Macrófagos e leucócitos são infiltrados para o local da deposição dos cristais e assim fagocitam o MSU, iniciando a resposta inflamatória (Sabrina et al., 2011; Terkelaub, 2001). Os sinais inflamatórios têm como características o calor, rubor, edema e dor (Vane e Bolting, 1995), além da ação de enzimas, ativação de mediadores químicos, migração celular e dano tecidual (Hayden et al., 2006). No momento da injúria tecidual ou devido a outros estímulos diversos, macrófagos e neutrófilos são recrutados e sua ativação leva a produção de citocinas, principalmente interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), alguns mediadores como enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e ativação da COX-2 (Kim et al., 2005; Medzhitov e Janeway, 1997; Walsh, 2003).

Com a ação inflamatória, há aumento da infiltração de células e, conseqüentemente, da respiração celular, devido à maior carga de oxigênio absorvida, gerando espécies reativas de oxigênio de forma exacerbada, o que desencadeia o estresse oxidativo na crise aguda da gota (Reuter et al., 2010). Sob essas circunstâncias o sistema de defesa do organismo ativa suas enzimas antioxidantes, GSH, SOD, CAT, GPx, GR e algumas vitaminas que também participam desse processo, como vitaminas C e E, para reestabelecer o equilíbrio entre as EROS e o controle antioxidante (Ferreira e Matsubara, 1997).

Atualmente, em casos de crises agudas da gota são prescritos os AINES, indometacina e naproxeno, adotados como fármacos de primeira escolha. Porém suas atividades farmacológicas benéficas são acompanhadas de efeitos adversos já conhecidos, como toxicidade gastrointestinal e renal, além da ocorrência de possíveis sangramentos gastrointestinais. Outras alternativas de tratamentos são os corticoides administrados por via intra-articular e hormônio adrenocorticotrópico.

Para o controle e prescrição da artrite gotosa há outro seguimento de fármacos voltados para a normalização dos níveis de ácido úrico no sangue, por meio da eliminação do mesmo pela urina, os uricosúricos. A Probenecida inibe de forma competitiva a proteína transportadora URAT-1 presente nas células epiteliais dos túbulos proximais, que tem como função promover a recaptação de urato nos rins. Entretanto, alguns fatores limitam seus efeitos desejáveis, como o fato desta substância exigir múltiplas doses diárias, com alto grau de desenvolvimento de urolitíase, sem levar em conta os diversos efeitos adversos deste componente (Dubchack e Falasca, 2010). O segundo fármaco uricosúrico de escolha

é a benzbromarona, muito eficiente para diminuir a hiperuricemia, porém sua metabolização ocorre por meio do sistema citocromo P450 no fígado, ocasionando hepatotoxicidade ao usuário (Lima, 2014).

O fármaco mais utilizado nos casos crônicos de gota é o alopurinol, um inibidor da xantina oxidase, enzima que converte hipoxantina a xantina e esta a ácido úrico. Este é um medicamento muito eficiente, mas possui uma gama de efeitos adversos, destacando-se a disfunção renal e hepática, nefropatias e erupções cutâneas. Além disso traz como agravante a ineficiência em episódios de artrite gotosa aguda, onde muitas vezes ocasiona complicações patológicas (Lima, 2014; Mediavilla e Miguel, 2011).

Em 2014, foi relatado que durante 10 anos de pesquisa, a artrite gotosa, uma doença crônica, altamente destrutiva e sem cura, possui um tratamento convencional completamente inadequado e com efeitos adversos tóxicos (Edwards e So, 2014). Contudo, a procura por tratamentos que auxiliem na melhoria da qualidade de vida e que tragam benefícios ao quadro clínico para os pacientes portadores desta patologia tornou-se o grande foco de estudo neste trabalho.

Müller demonstrou o efeito hipouricêmico produzido pelo extrato etanólico de *L. pinaster* e de seus principais constituintes químicos em camundongos Swiss hiperuricêmicos, proporcionado pela inibição da xantina oxidase hepática (Müller et al., 2019).

Em estudos prévios realizados com o extrato etanólico de *L. pinaster* foram obtidos resultados promissores sobre a inflamação e dor, semelhantes aos efeitos dos fármacos de referência usados, como diclofenaco, dipirona e morfina (Ferreira, 2010; Ferreira et al., 2019; Guzzo et al., 2008).

Os resultados obtidos nos experimentos anteriores utilizando o extrato etanólico de *L. pinaster* e constituintes químicos principais, aliados à necessidade de novos medicamentos eficazes e com efeitos adversos minimizados para o tratamento da gota, justificam a proposta do presente trabalho em avaliar os efeitos do referido extrato e de seus constituintes na artrite gotosa e sobre o estresse oxidativo.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Equipamentos, instrumentos, solventes, reagentes e fármacos

Os testes foram realizados utilizando-se os seguintes equipamentos:

- Analgesímetro eletrônico - Insight Equipamentos;
- Espectrofotômetro UV-VIS modelo Cary 50 Bio – Simple Read;
- Balanças modelos AUW220D e UX420H - Shimadzu;
- Lavadora modelo USC-4800A 12L - Ultrasônica Unique;
- Leitor de Elisa - Molecular Devices;
- Equipamento de análise hematológica modelo BC-2800Vet - Mundry;
- Citômetro de fluxo FACS Calibur - BD;
- Centrífuga 5810 R - Eppendorf Centrifuge;
- Homogeneizador de eppendoff
- Vórtex - LS Logen Scientific;
- Refrigerador -80° C – Thermo Scientific;
- Estufa com circulação e renovação de ar modelo MA035 - Marconi;
- Estufa a 40° C constantes para secagem do extrato - Biociclo;
- Moinho de facas - Marconi;
- Evaporador rotativo modelo R-2010 - Buchi;
- Percolador de inox 2000 mL;
- pHmetro - Digimed DM20.

Para os experimentos utilizou-se:

- Cetamina ou Dopalen e relaxante muscular xilazina ou Dopaser (Sespro Indústria e Comércio Ltda);
- Indometacina (Sigma Aldrich)
- Vitamina C (Sigma Aldrich)
- Seringa hipodérmica (KDL do Brasil) para administração das soluções;
- Lâmina de bisturi estéril de aço carbono (Maxicor) para retirada do tecido periarticular.
- Peróxido de hidrogênio - H₂O₂;
- BSA (Sigma Aldrich);
- Solução ABC;

- Folin & Ciocalteu's Phenol (Sigma Aldrich);
- MTT (Sigma Aldrich);
- Pirogalol (Sigma Aldrich);
- FACS dill (Soro de rato e soro fetal bovino);
- FACS Flow (Becton Dickinson and Company, BD biosciences);
- Marcador de neutrófilos – PE Anti-Mouse Ly-6G (BD Biosciencies);
- Tween 80 (Synth);
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec).

6.1.1 Preparo de soluções

6.1.1.1 Solução tampão PBS concentrada 10x pH 7,2

Em um balão volumétrico de 1 L adicionou cloreto de sódio (82,0 g), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (19,83 g) e fosfato de sódio monobásico (3,55 g), previamente solubilizados em água MilliQ. Ao final, aferiu o volume com água Milli Q. Conferiu o pH 7,2 do tampão no pHmetro. A solução foi armazenada em geladeira.

6.1.1.2 Solução tampão PBS diluída 1x (90 % de água: 10% de PBS)

A solução tampão PBS foi preparada no dia do uso. A solução tampão PBS 10x (100 mL), em temperatura ambiente, foi diluída em água Milli Q, sendo adicionada a um balão volumétrico de 1 L e o volume foi aferido.

6.1.1.3 Solução de albumina bovina (BSA) 3% em PBS

Três gramas de albumina do soro bovina - BSA (Sigma Aldrich) foram transferidos para um balão de 100 mL e o volume aferido com a solução tampão de PBS 1x para a obtenção de uma solução de 3%.

6.1.1.4 Indometacina e vitamina C

A solução da indometacina foi preparada, na dose de 3 mg/kg. A indometacina foi diluída em 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada (95%), sendo assim utilizado 950 uL de água destilada e 50 uL de DMSO. Esta solução foi utilizada como controle positivo para a avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. A vitamina C foi

preparada na dose de 250 mg/kg por diluição em água destilada. Esta solução foi usada como controle positivo para a avaliação da atividade antioxidante.

6.1.1.5 Ácido *E*-licnofórico, vitexina, ácido cinâmico, rutina, quercetina, lupeol, estigmasterol, ácido cafeico e ácido clorogênico (15 mg/kg) e extrato etanólico de *L. pinaster* (40,125, 375 mg/kg)

Todas as substâncias e o extrato etanólico de *L. pinaster* foram solubilizados com veículo composto por uma mistura de tween 80, DMSO e água destilada, na proporção de 1:1:8, respectivamente, e homogeneizados em aparelho vortéx.

6.1.1.6 Cristais de urato monodissódico

A suspensão de MSU foi utilizada para induzir a artrite gotosa na articulação fêmur-tibial de camundongos. Esta foi preparada dissolvendo 0,01 g de cristais de urato monossódico em 1 mL de PBS 1x.

6.2 Material Vegetal

As partes aéreas de *L. pinaster* foram coletadas no município de Itabirito, MG, com autorização do Instituto Chico Mendes, IBAMA (nº 49183-3). A espécie vegetal foi identificada pelo botânico Dr. Júlio Antônio Lombardi e a exsicata depositada no Herbarium do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB/UFMG), com número de registro 19.520.

As partes aéreas de *L. pinaster* foram secas em estufa ventilada a 40 °C e pulverizadas em moinho de facas, originando 4,4 kg, de material vegetal seco.

6.2.1 Obtenção do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster*

A extração foi realizada com 2,0 kg de material vegetal seco e pulverizado, previamente umedecido com etanol e devidamente acondicionado em percolador de aço inox. A percolação foi conduzida com etanol (P.A) até a exaustão do material vegetal. O solvente extrator foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura inferior a 40 °C. O extrato foi mantido em estufa a 40 °C para completa

evaporação do solvente até peso constante, obtendo-se então 265,0 g de extrato etanólico seco (EEL).

6.2.2 Obtenção dos constituintes químicos principais presentes em *L. pinaster* e utilizados para testes de atividade biológica

A Rutina, quercetina, vitexina, lupeol, estigmasterol e os ácidos cinâmico, cafeico e clorogênico foram substâncias isoladas, em estudos anteriores, de extratos de *L. pinaster*. No presente trabalho, estas substâncias, utilizadas nos ensaios *in vivo* de atividade biológica, foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich. O ácido *E*-licnofórico usado neste trabalho foi anteriormente isolado, no Laboratório de Plantas Medicinais (LAPLAMED) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica (PPG CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), por meio de fracionamento cromatográfico do extrato hexânico das partes aéreas de *L. pinaster* (EHL), pela Mestre Camila Müller do LAPLAMED/PPG CiPharma, no ano de 2017, e gentilmente cedido para este trabalho.

7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

7.1. Animais experimentais

O protocolo experimental utilizado neste trabalho foi aprovado na Comissão de Ética no uso Animal da UFOP (CEUA-UFOP), nº 2016/46. Para avaliação da atividade antiartrite gotosa foram usados camundongos C 57 Black 6, machos, pesando entre 20-25 g e fornecidos pelo CCA da UFOP. Os animais foram mantidos em gaiolas, separados em grupos de cinco, respeitando o ciclo 12/12h claro/escuro, sob temperatura controlada e com ração e água “*ad libitum*”.

Os tratamentos com extratos, substâncias, fármacos padrões e veículos foi realizado por via oral utilizando-se agulha de gavagem acoplada a seringa (**figura 10**).

7.2. Modelo experimental de hipernocicepção inflamatória: teste de pressão crescente na pata de camundongo (filamentos de von Frey) e da atividade antiartrite gotosa

Na avaliação da atividade antiartrite gotosa, foi utilizado o modelo animal de camundongos machos da linhagem C 57BL 6 com indução da artrite pela injeção intra-

articular MSU. O procedimento realizado foi de acordo com metodologia descrita por Amaral et al., (2012). Para avaliação da hipernocicepção foi utilizado o Analgesímetro Eletrônico – Insight Equipamentos, seguindo a metodologia descrita por Möller e colaboradores (1998) e por Cunha e colaboradores (2004).

Para adaptação do animal ao ambiente, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico do equipamento durante 15 minutos, antes do experimento (**Figura 8**).



Figura 8: Camundongos em adaptação ao ambiente para iniciar o experimento de hipernocicepção.

A atividade antinociceptiva foi medida em dois tempos, antes de qualquer intervenção e após 6 horas da injeção intra-articular de MSU. Após o período de adaptação, o limiar nociceptivo basal foi medido (**Figura 9**), tempo zero (T0):

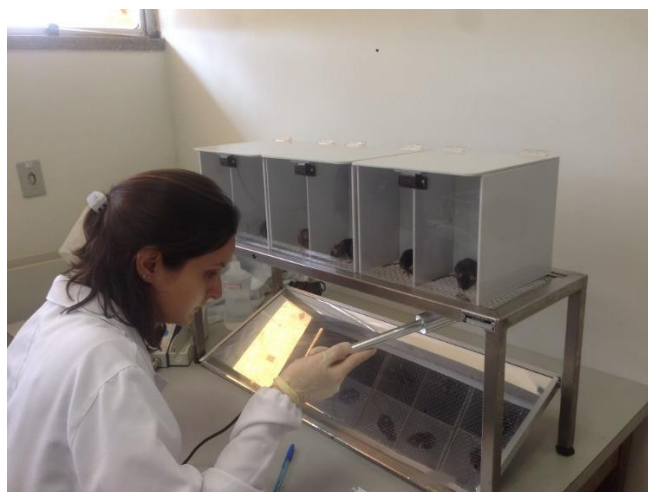


Figura 9: Imagem da medição do limiar de nocicepção com o equipamento analgesímetro.

Com auxílio do analgesímetro foi feita a pressão na pata direita do camundongo, até que essa pressão crescente sensibilizasse os nociceptores periféricos estimulando o efeito reflexo do camundongo, de forma que ele retirasse a pata (estímulo mecânico). Os animais com maior limiar de nocicepção permaneciam por mais tempo com a pata sobre o aparelho, já os animais com os nociceptores sensibilizados devido a inflamação induzida, retiravam a pata mais rapidamente. Este processo foi repetido por no máximo 6 vezes por animal, e fez-se a média de apenas 3 medidas. Dessa forma, registrou valores em gramas, já o transdutor de pressão trabalha conectado a um contador digital de força expressa em gramas.

Em seguida iniciou os tratamentos:

O grupo controle positivo recebeu, por via oral, 0,2 mL de indometacina (3 mg/kg).

Os grupos controle da inflamação (MSU) e controle normal (controle negativo) receberam, por via oral, 0,2 mL do veículo (1 Tweem 80:1 DMSO: 8 água purificada).

Em cada grupo de 6 camundongos foi administrado, por via oral, 0,2 mL de cada uma das doses do extrato e das substâncias. O EEL foi administrado nas doses de 40, 125, 375 mg/kg e as substâncias (rutina, quercetina, lupeol, estigmasterol, vitexina e ácidos *E*-licnofórico, cinâmico e clorogênico) na dose de 15 mg/kg.

Após 1 hora, todos os animais foram anestesiados com associação de cetamina/xilazina, nas doses de 100 e 10 mg/kg, respectivamente. Assim que se obteve o efeito da anestesia, a artrite gotosa foi induzida em todos os grupos, exceto no grupo controle normal, por meio de injeção intra-articular de 10 µL de MSU suspensos em PBS (10 µg/µL). O controle normal recebeu apenas PBS como injeção intra-articular.

Decorridas seis horas após os tratamentos foi realizada a medida da nocicepção no tempo de 6 horas (T6).

7.1.1 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

Para avaliação dos efeitos de EEL e substâncias na artrite gotosa foram realizadas contagens de leucócitos totais e neutrófilos no lavado da cavidade periarticular e a dosagem de citocinas pró-inflamatórias no tecido periarticular.

A avaliação dos parâmetros inflamatórios sucedeu após a avaliação da nocicepção no tempo de 6 horas, seguida da aplicação intra-articular de MSU. Para a avaliação da migração de neutrófilos para a articulação fêmur-tibial (cavidade periarticular do joelho), os camundongos foram eutanasiados pela administração da associação de cetamina/xilazina (300 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente). Posteriormente, o tecido periarticular dos animais

foi removido e a cavidade lavada, por 2 vezes, com 10 uL da solução de BSA 3% e 2 uL EDTA. O lavado intra-articular foi acondicionado em eppenforff contendo 88 uL de solução de albumina 3% e 2 uL de EDTA, totalizando 100 uL de solução. Estes foram destinados à contagem total e diferencial de leucócitos (**figura 10**)

7.1.2 Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada no equipamento de autoanálise hematológica específico para uso veterinário, utilizando aproximadamente de 10 uL do lavado intra-articular. Para a contagem de células de camundongo, o ajuste do equipamento foi configurado em “Animal 3WB”.

7.1.3 Contagem de neutrófilos

Cerca de 90 uL do lavado intra-articular foi usado para a contagem de neutrófilos. O material de cada eppendorf (10 uL de lavado intra-articular, 88 uL de solução de albumina 3% e 2 uL de EDTA) foi transferido para tubos de citometria, sendo um tudo para cada amostra.

O branco constituiu-se de um pool de 5 uL de cada amostra, sem o marcador de neutrófilos.

Utilizou-se 1 uL do marcador de neutrófilos (Ly6-G), diluído em 499 uL de uma solução de FACS (10% soro de rato e 10% soro fetal bovino), na proporção anticorpo: FACS de 1:499. Esta solução foi utilizada para impedir a ligação do anticorpo a sítios inespecíficos. O anticorpo diluído, 10 uL, foi adicionado à cada tubo, com exceção do tubo contendo o branco. Em seguida todos os tubos foram homogeneizados em vórtex, armazenados no escuro e deixados em repouso por 20 minutos.

Passados os 20 minutos, 1 mL de PSB filtrado foi adicionado em todos os tubos, incluindo o branco.

Posteriormente, todos os tubos foram centrifugados à 3000 rpm/min, durante 15 minutos. Ao final, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo e os resultados foram obtidos em porcentagem de neutrófilos em cada amostra.

7.2 Dosagens das citocinas IL1- β e TNF α no tecido periarticular

Para a análise das citocinas pró-inflamatórias, presentes na cavidade articular durante o processo inflamatório da artrite gotosa induzida em camundongos, foi necessário preparar o homogenato. Primeiramente, o tecido articular fêmur-tibial foi triturado e diluído em 1000 μ L de PBS e então homogeneizado.

A dosagem das citocinas IL1- β e TNF α foi realizada seguindo o protocolo dos Kits Prepro Tech Sandwich Elisa.

Inicialmente, o anticorpo de captura, anticorpo de detecção, o avidin – HRP e o padrão do kit foram reconstituídos e alíquotas foram obtidas conforme protocolo.

Para preparação da placa de Elisa o anticorpo de captura foi centrifugado por 3 min à 10000 rpm e diluído em 9,9 mL de PBS. Alíquotas de 100 μ L do anticorpo de captura foram adicionadas em cada poço da placa de Elisa estéril e a placa incubada durante 18 horas a 25 °C, ou 2-4 horas por 37 °C.

Na sequência, o material foi aspirado e os poços lavados por 4 vezes com 300 μ L de solução de lavagem. Após, a placa foi invertida para retirada do excesso e 300 μ L de solução de bloqueio foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A solução foi novamente aspirada e os poços lavados por 4 vezes com solução de lavagem. Após, 100 μ L da amostra foram adicionados aos poços, em duplicata e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido mais uma vez.

O avidin – HRP foi centrifugado por 3 minutos à 10000 rpm, em seguida foi transferido para tubo falcon e o diluente foi adicionado até volume de 11 mL. Desta solução, 100 μ L foram adicionados aos poços e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Após, a solução foi aspirada e lavada por 4 vezes com solução de lavagem.

Por fim, 100 μ L da solução de ABTS foram adicionados em cada poço e a leitura foi realizada à cada 5 minutos, durante 50 minutos, à 405 nm, no leitor de Elisa.

A leitura final da absorbância foi realizada no tempo de 50 minutos. O valor obtido foi inserido em uma curva padrão, construída de acordo com os mesmos procedimentos descritos no protocolo da amostra, e assim foram obtidas as concentrações, em ng/mL, das citocinas IL1- β e TNF- α .

7.3. Avaliação do estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo, os animais dos grupos controle da inflamação (MSU) e controle normal (controle negativo) receberam, por via oral, 0,2 mL do veículo (1 Tweem 80:1 DMSO: 8 água purificada). O grupo controle positivo recebeu, por gavagem, 0,2 mL de vitamina C na dose de 250 mg/kg.

Aos animais dos demais grupos foi administrado, por via oral, 0,2 mL de cada uma das doses do extrato e substâncias. EEL foi administrado nas doses de 40, 125, 375 mg/kg e as substâncias (rutina, quercetina, lupeol, estigmasterol, vitexina e ácidos *E*-licnofórico, cinâmico e clorogênico) na dose de 15 mg/kg.

Após 1 hora, todos os animais foram anestesiados com associação de cetamina/xilazina, nas doses de 100 e 10 mg/kg, respectivamente. Assim que se obteve o efeito da anestesia, a artrite gotosa foi induzida em todos os grupos, exceto para o controle normal, por meio de injeção intra-articular de cristais de urato monossódico (MSU) suspensos em PBS (10 ug/uL). O controle normal recebeu apenas PBS como injeção intra-articular.

No tempo de 6 horas após administração intra-articular de MSU, os animais foram eutanasiados pela injeção intraperitoneal da combinação anestésica cetamina/xilazina (300 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). O tecido articular fêmur-tibial dos camundongos foi removido (Figura 12). Em seguida, os níveis de estresse oxidativo foram determinados pela dosagem das SOD e CAT, presentes no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial do camundongo.

7.2.1 Preparo do Homogenato

Para a análise das enzimas presentes no estresse oxidativo (SOD e CAT) foi necessário preparar o homogenato. Primeiramente, o tecido articular fêmur-tibial foi triturado e diluído em 500 uL de PBS e então homogeneizado.

O homogenato foi conservado em freezer à temperatura de – 80 °C.

7.2.2 Dosagem de proteínas totais (Método de Lowry)

O método de Lowry é a proposta de metodologia mais adequada para determinação de proteínas totais, pois possui alta sensibilidade e pode estabelecer a concentração de proteínas em diversos meios biológicos, além de produtos alimentícios (Zaia et al., 1998).

Este método consiste na redução do reagente Folin-Ciocalteu na presença de proteínas, sendo a reação catalisada pelo Cu (II) e, dessa forma, produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm. Para aumentar a sensibilidade da metodologia de Lowry em um menor comprimento de onda, Sargent (1987) sugeriu modificações que aumentaram a sensibilidade em até 50 vezes. Neste caso, o composto final absorve no comprimento de onda de 690 nm (Sargent, 1987).

A dosagem de proteínas totais presentes no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial do camundongo foi realizada seguindo a metodologia de Lowry e colaboradores (1951) e de Sargent (1987) e, dessa forma, pôde-se mensurar os valores de SOD e CAT presentes no tecido correlacionando-os com a quantidade de proteínas encontradas na articulação.

Para a determinação da concentração de proteínas totais foi necessário preparar uma curva padrão de solução de albumina de soro bovino.

Para obtenção da curva padrão foi preparado o reagente Folin, composto por 1 mL de Folin & Ciocalteu e 2 mL de água destilada e as Soluções A, B e C, obtidas da seguinte forma:

- Solução A: preparada com 30 g de Na_2CO_3 e 4 g de NaOH em 1 L de água destilada;
- Solução B: preparada a partir da solubilização de 0,2 g de CuSO_4 em 10 mL de água destilada;
- Solução C: preparada com a solubilização de 0,4 g de tartarato de sódio e potássio em 10 mL de água destilada.

Para obtenção do tampão ABC, misturou-se de 1 mL da solução B com 1 mL da solução C e 100 mL da solução A.

Diversas diluições foram preparadas para determinar diferentes concentrações de albumina, iniciando com a concentração padrão de 1,6 mg/mL. Assim, pôde-se construir a curva padrão de albumina de soro bovino.

Para a leitura das amostras de soluções diluídas de albumina foram necessários os seguintes procedimentos:

- Para uma placa de Elisa, em duplicata, pipetou-se 20 uL de cada diluição da amostra padrão de albumina;
- Adicionou-se em cada poço da placa 200 uL da solução ABC;
- Deixou-se descansar durante 10 minutos no escuro;
- Adicionou-se 20 uL da solução de Folin diluída;
- Novamente, deixou-se em repouso por 10 minutos no escuro;
- Por fim, foi realizada a leitura das absorbâncias no leitor de Elisa a 700 nm.

Dessa forma, obteve-se a curva padrão de proteínas totais.

7.2.3 Diluição do Homogenato

Para dosagem de proteínas totais de cada amostra, o homogenato foi diluído utilizando 25 uL do homogenato em 475 uL de água destilada, homogeneizado em vórtex e mantido em banho de gelo.

7.2.4 Dosagem de proteínas totais no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial.

Em uma placa de Elisa adicionou-se 20 uL do homogenato diluído, em duplicata. Na sequência adicionou-se 200 uL da solução ABC, o experimento foi deixado em repouso por 10 minutos, no escuro. Após, adicionou-se 20 uL de Folin e novamente a placa foi armazenada no escuro por 10 minutos. Ao final, realizou-se a leitura, a 700 nm, no leitor de Elisa.

7.2.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A dosagem da SOD foi realizada segundo metodologia descrita por Dieterich e colaboradores (2000), com adaptações.

O preparo de reagentes necessários constituiu-se de 22 mg de MTT dissolvidos em 4 mL de PBS (pH = 7) e 2 mg de pirogalol em 160 mL de PBS.

Devido a fotossensibilidade dos reagentes, todos foram manuseados no escuro.

Os procedimentos foram:

- Para poços da placa de Elisa, em duplicata, foram pipetados 30 uL do homogenato;
- No branco foram adicionados 45 uL de PBS;
- No padrão foram adicionados 30 uL de PBS;
- Em todos os poços foram adicionados 99 uL de PBS e 6 uL da solução de MTT;
- Com exceção do branco, foram adicionados 15 uL da solução de pirogalol em todos os poços, completando o volume de 200 ml em todos os poços;
- A placa de Elisa foi incubada a 37 °C, por 5 minutos;
- A reação foi interrompida pela adição de 150 uL de DMSO em todos os poços;
- Por fim, as leituras das absorbâncias foram obtidas no leitor de Elisa à 570 nm.

Cada unidade de SOD foi determinada por miligrama de proteínas totais.

7.2.6 Atividade da Catalase (CAT)

A dosagem da CAT foi determinada seguindo a metodologia descrita por Aebi (1984), com algumas adaptações. Utilizado como reagente peróxido de hidrogênio na quantidade de 40 uL, diluindo-o em 25 uL de tampão PBS (pH= 7).

Inicialmente, o espectrofotômetro foi aferido com água destilada, na sequência realizou-se a leitura do branco no comprimento de onda de 240 nm, usando 500 uL de tampão PBS com 10 uL do homogenato e o valor da absorbância foi registrado.

Para iniciar a leitura das amostras foi necessário usar 500 uL da solução diluída de peróxido de hidrogênio, juntamente com 10 uL do homogenato. As leituras foram feitas no comprimento de onda de 240 nm e as absorbâncias registradas nos tempos: 0 segundos (T0), 20 segundos (T20) e 40 segundos (T40). Todas as amostras foram manuseadas no escuro. A absorbância de cada tempo foi subtraída pela absorbância do branco.

Cada unidade de CAT foi determinada por miligrama de proteínas totais.

7.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o *software GraphPad Prism 5.0* seguida de pós-teste Dunnet. Foi adotado intervalo de confiança de 95%, sendo as diferenças consideradas significativas quando o valor P for menor que 0,05 ($P < 0,05$).

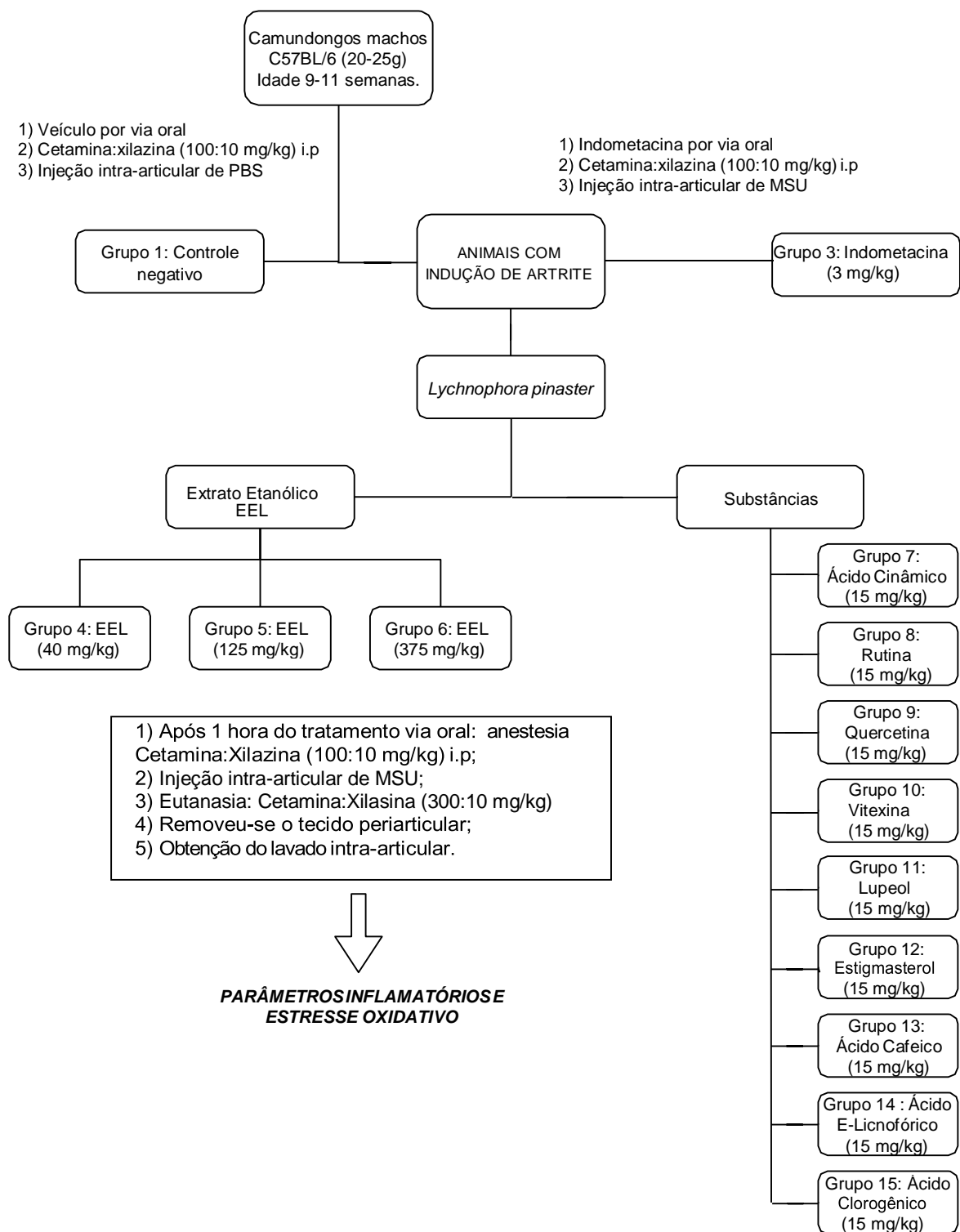


Figura 10: Delineamento experimental para avaliação da atividade antiartrite gotosa e estresse oxidativo do extrato etanólico de *L. pinaster* e de seus constituintes químicos principais.

8. RESULTADOS

8.1. Avaliação do efeito antinociceptivo do extrato de *L. pinaster* e de seus constituintes químicos sobre a hiperalgisia induzida pelo MSU.

Os resultados foram todos calculados pela porcentagem da variação do limiar de nocicepção entre o tempo 0 horas e tempo 6 horas. Os animais do grupo controle negativo (normal), que receberam veículo por via oral e através da injeção periarticular, não tiveram grandes variações entre os dois tempos (Tempo 6h-Tempo 0h), o que simula uma situação basal. Como esperado, os animais do controle MSU (controle da inflamação), não tratados, mostraram baixo limiar de nocicepção, demonstrando valor de nocicepção final menor que o inicial, o que está relacionado com a inflamação ocasionada pela administração de MSU intra-articular, pois sem o tratamento e com inflamação induzida, os nociceptores estavam sensibilizados e não há ação analgésica. Ao analisar o grupo inflamado (MSU), nota-se que seu limiar de nocicepção foi reduzido e seus valores são significativamente diferentes aos da indometacina e do EEL (375 mg/kg), (**figura 11**).

Após 6 horas da indução da inflamação com MSU, seguida da administração da indometacina e dos extratos, pôde-se observar que houve variação do limiar da sensibilização dos nociceptores. A **figura 11**, mostra o gráfico plotado com os resultados obtidos da nocicepção em variação da porcentagem da medida da nocicepção dos controles, indometacina, normal e inflamado (MSU) e dos extratos nas 3 doses avaliadas, 40, 125 e 375 mg/kg.

A indometacina (grupo controle positivo), anti-inflamatório não esteroideal (AINE), foi utilizado como referência para a avaliação do limiar de nocicepção. Para o grupo controle positivo pôde-se notar que houve aumento do limiar da nocicepção resultando em efeito antinociceptivo. O aumento do limiar de nocicepção também foi observado nos animais tratados com o EEL, na dose de 375 mg/kg, comportando-se de maneira equivalente a indometacina.

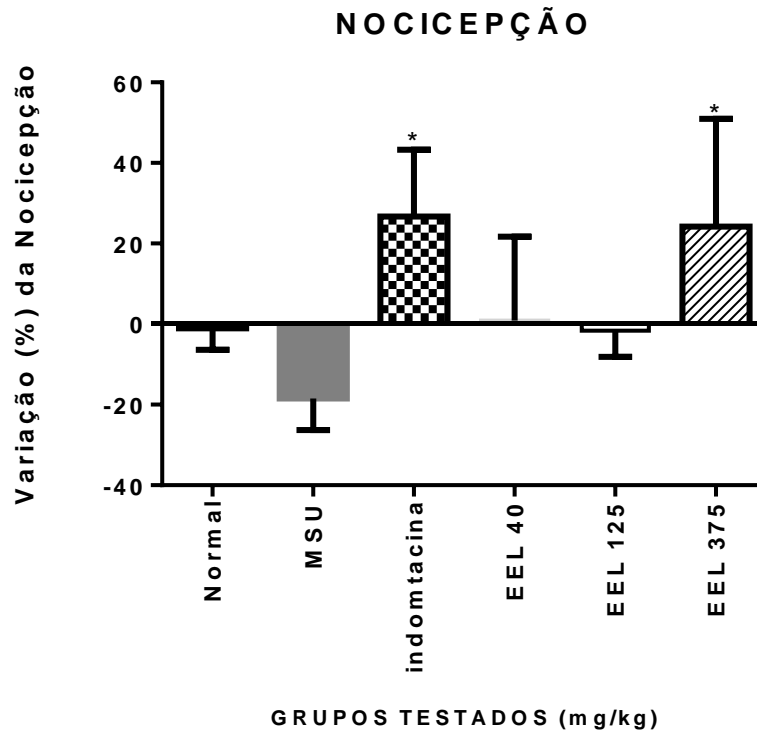


Figura 11: Efeitos da indometacina e do EEL nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, sobre a hiperalgesia em camundongos C57BL/6 no modelo de artrite induzida por cristais MSU. Os valores são representados em variação percentual da medida da nocicepção após 6 horas de tratamento. * $P < 0,005$ em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

A **figura 12**, ilustra a variação da medida da nocicepção nos grupos de animais tratados com as principais substâncias encontradas em *L. pinaster*, indometacina e veículo. Como previsto, o grupo tratado com injeção intra-articular de MSU, demonstrou redução em seu limiar de nocicepção. O grupo controle normal se manteve em condições basais. A indometacina foi usada como controle positivo. A quercetina, lupeol, estigmasterol e ácido cinâmico apresentaram efeito antinociceptivo. Quercetina, estigmasterol e ácido cinâmico aumentaram o limiar da dor em proporções similares à indometacina. Já o lupeol se comportou de forma ainda mais efetiva que o fármaco de referência. Portanto o lupeol foi a substância com maior efeito antinociceptivo quando comparado ao controle da inflamação (MSU).

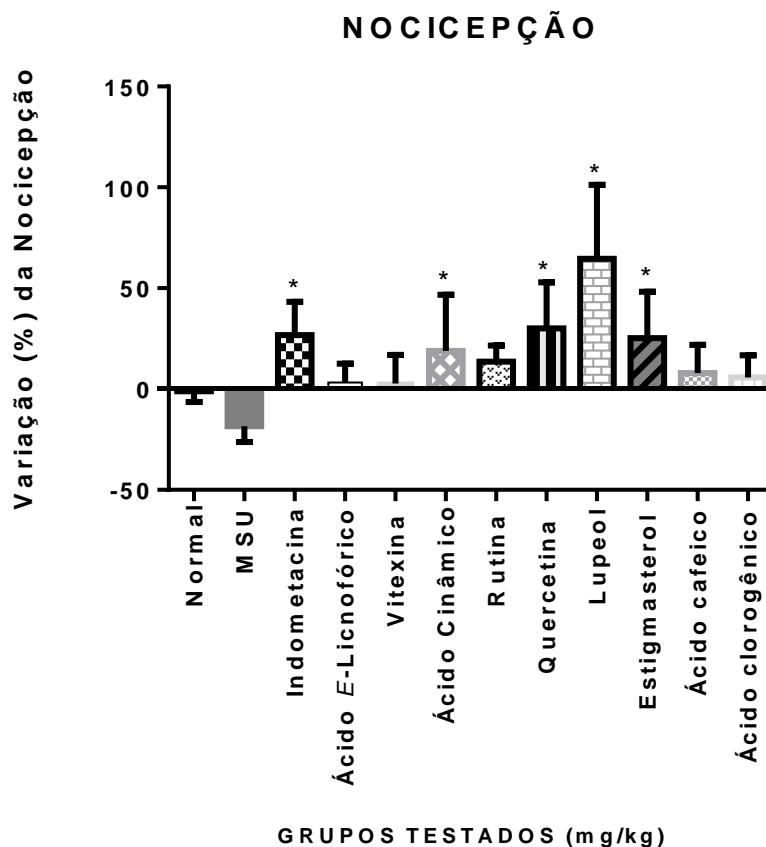


Figura 12: Efeito das principais substâncias presentes no EEL, na dose de 15 mg/kg, e da indometacina sobre a hiperalgisia em camundongos C57BL/6 no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em variação percentual da medida da nocicepção após 6 horas de administração de MSU seguida de tratamento. *P <0,05 em comparação ao controle MSU, (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

8.2. Avaliação dos parâmetros inflamatórios

8.2.1 Migração de neutrófilos

Para a avaliação da migração de neutrófilos foi realizada a contagem total de leucócitos no lavado intra-articular por citometria de fluxo. Foram selecionados alguns resultados obtidos da citometria de fluxo para serem apresentados como exemplos (**figuras 13 e 14**) gráficos plotados no software Flow Jo Diagnostic tool v10.0.7. A leitura do branco foi realizada através de um pool de amostras sem o marcador de neutrófilos. Então determinou-se um quadrante de leucócitos totais do branco. E a partir do quadrante de leucócitos totais do branco determinou-se 4 quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4). Sendo que o quadrante Q3 foi definido como aquele sem a presença de células. Na sequência os gráficos definidos no branco, foram utilizados para sobrepor aos resultados das amostras,

sendo que as células marcadas com o Ly6 foram contadas e apresentadas no quadrante Q3, pois após marcadas, cada célula emite uma fluorescência com uma determinada frequência, e no caso a frequência dos neutrófilos marcados com Ly6, encontra-se no quadrante Q3.

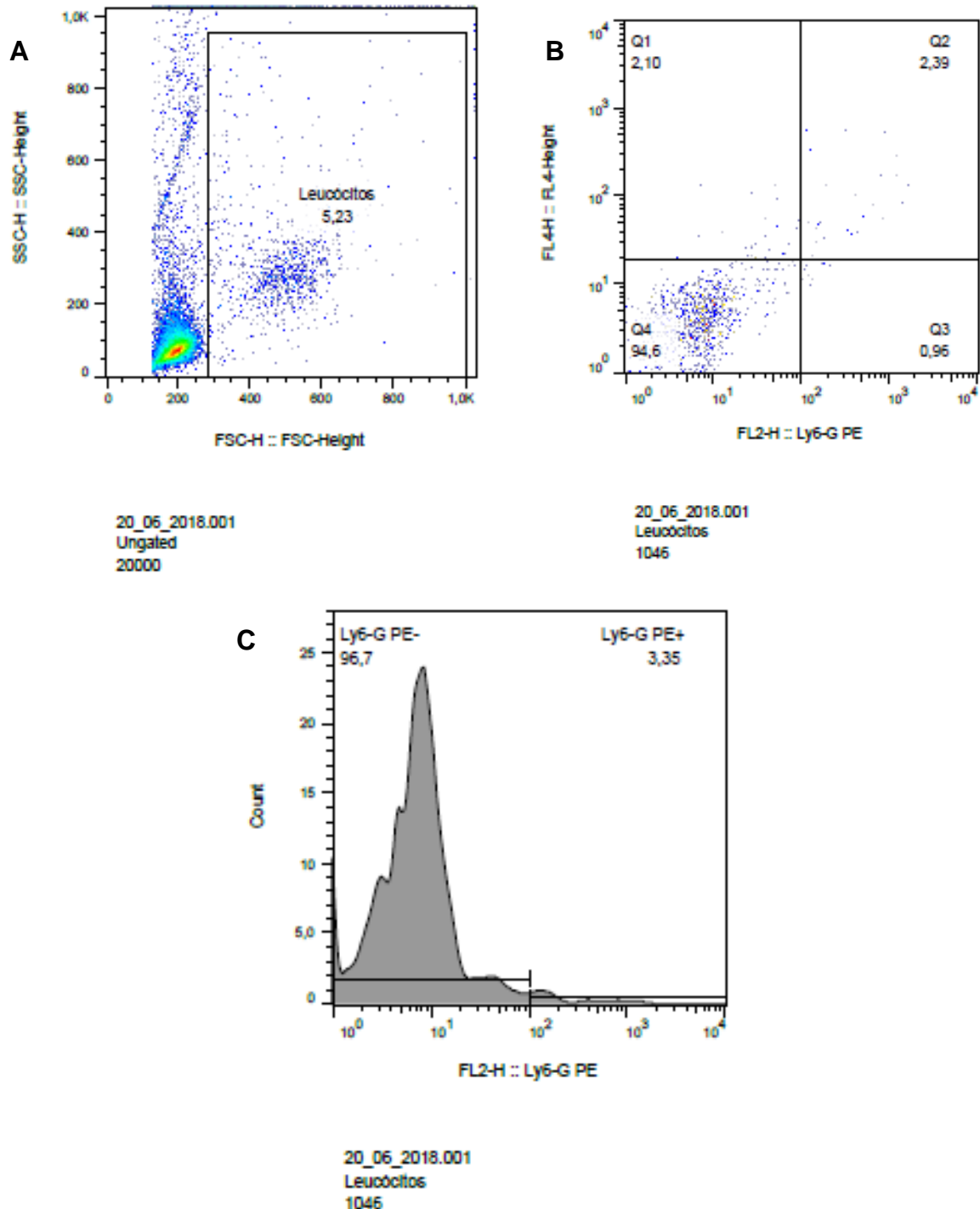


Figura 13: Gráficos obtidos com o software Flow Jo para determinação do quadrante Q3 do branco (amostra sem o marcador de neutrófilos (Ly6 G)). Determinação do quadrante da região de leucócitos totais (A). Demarcação do quadrante Q3, onde estão situados os leucócitos marcados com Ly6 G, que são os neutrófilos (B). Histograma gerado à partir das leucócitos totais e região demarcada de neutrófilos (C).

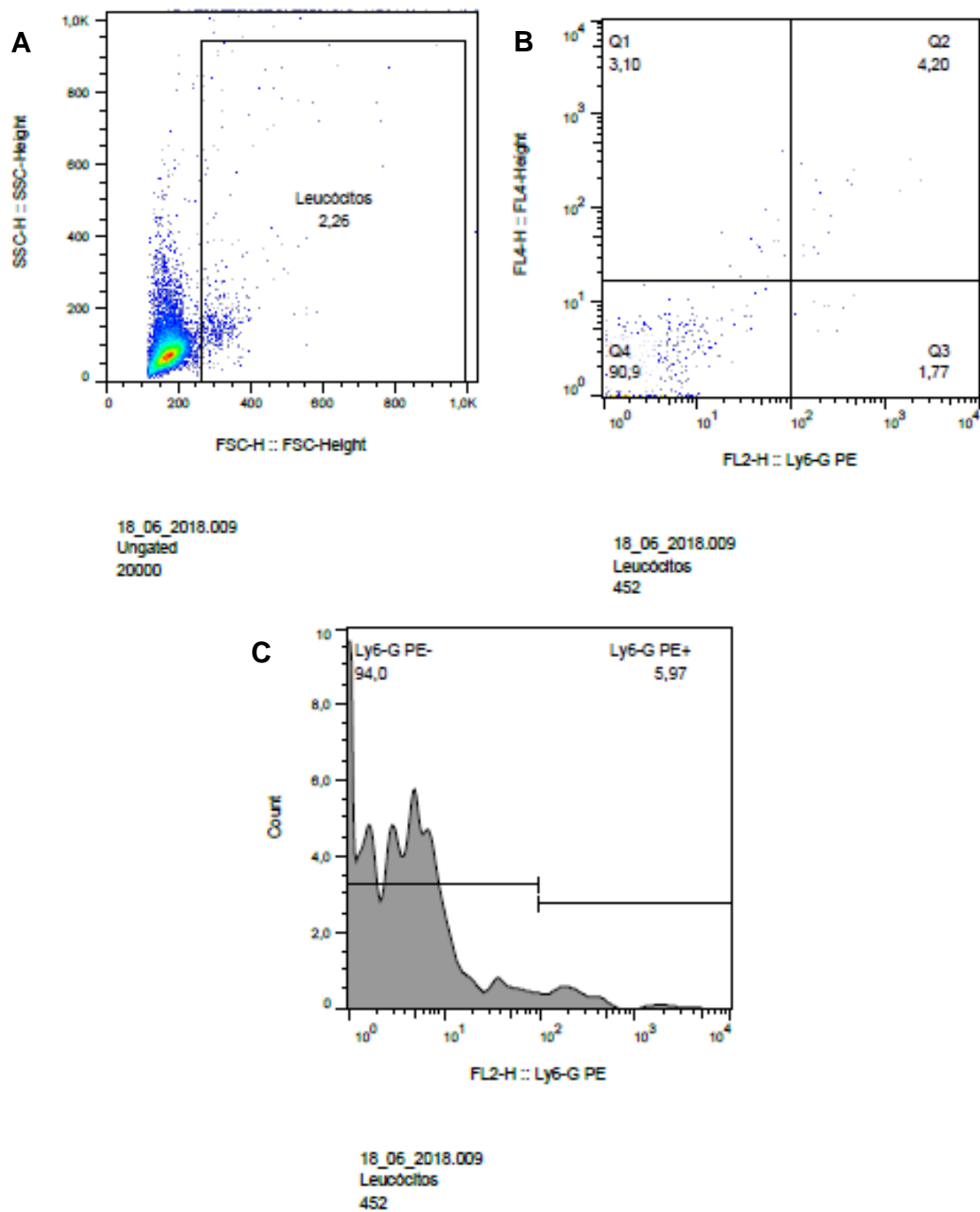


Figura 14: Gráficos obtidos com o software Flow Jo na análise da amostra tratada com ácido clorogênico, substância presente na *Lychnophora pinaster*, com marcador de neutrófilos (Ly6 G). Determinação do quadrante da região de leucócitos totais (A). Demarcação do quadrante Q3, onde estão situados os leucócitos marcados com Ly6 G, que são os neutrófilos (B). Histograma gerado à partir dos leucócitos totais e região demarcada de neutrófilos (C).

Como demonstrado na **figura 15**, os efeitos de EEL, nas três doses avaliadas, e de todas as principais substâncias obtidas de *L. pinaster* foram significativamente diferentes ao controle inflamado (MSU), mostrando que o EEL tem grande capacidade de reduzir a inflamação por inibir a migração de neutrófilos.

Migração de neutrófilos para a cavidade periarticular da região fêmur-tibial

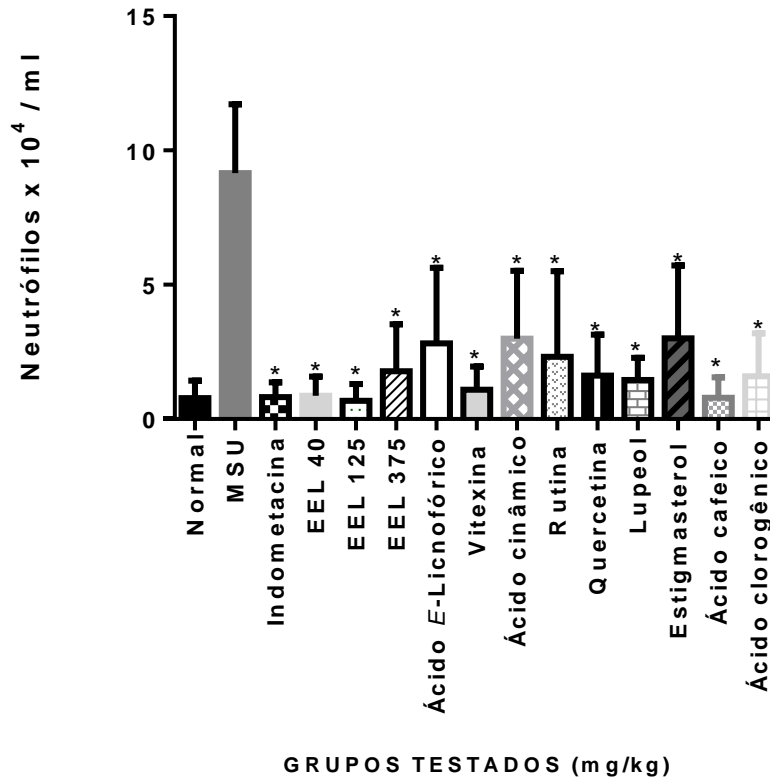


Figura 15: Efeito do extrato etanólico de EEL, nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias (15 mg/kg) presentes no EEL e da indometacina sobre a migração de neutrófilos para a cavidade periarticular da articulação fêmur-tibial (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em neutrófilos x 10⁴ após 6 horas de tratamento. *P < 0,005 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnett).

8.2.2 Quantificação da citocina IL-1β

A avaliação da concentração da citocina pró-inflamatória IL-1β presente na cavidade periarticular de camundongos C57BL/6 tratados com EEL (40, 125 e 375 mg/kg) e principais substâncias presentes em *L. pinaster* demonstrou que o tratamento com EEL, nas três doses administradas, e os tratamentos com ácido *E*-licnofórico, vitexina, ácido cinâmico, rutina, estigmasterol e ácido cafeico foram capazes de diminuir a concentração da interleucina IL-1β, quando comparado ao controle inflamado (MSU), (**figura 16**).

QUANTIFICAÇÃO DA CITOCINA IL-1 β

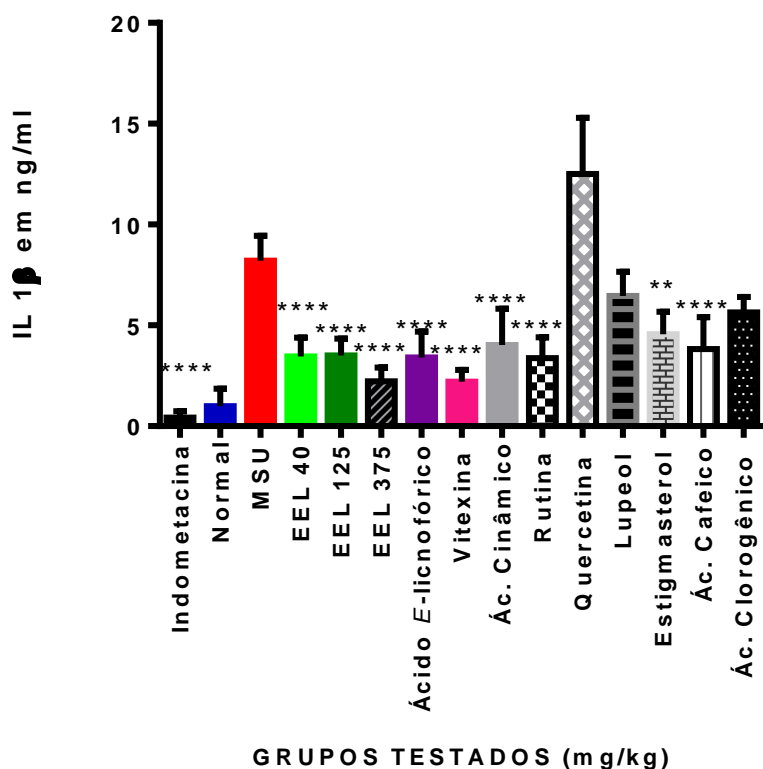


Figura 16: Efeito do EEL, nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias presentes no EEL e da indometacina sobre a atividade da citocina IL-1 β presente no tecido periarticular da articulação fêmur-tibial (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em ng/mL após 6 horas de tratamento. *P < 0,005 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

8.2.3 Quantificação da citocina TNF- α

A quantificação da citocina TNF- α presente na cavidade periarticular de camundongos C57BL/6 tratados com EEL (40, 125 e 375 mg/kg) e principais substâncias presentes em *L. pinaster* foi feita após 6 horas da indução da inflamação com injeção intra-articular de MSU, como demonstrado na (figura 17). A indometacina, como esperado, foi a substância com maior atividade anti-inflamatória. Os grupos tratados com o EEL, nas três doses avaliadas, com a vitexina e o ácido cafeico apresentaram redução da citocina pró-inflamatória TNF- α em relação ao grupo controle da inflamação (MSU).

O controle negativo do experimento (sem indução da inflamação), denominado controle normal, apresentou uma menor concentração de TNF- α , na região onde foi induzida a inflamação, significativamente diferente ao controle inflamado, o que valida o experimento.

Nenhum dos tratamentos apresentou atividade similar ou superior ao fármaco de referência, indometacina.

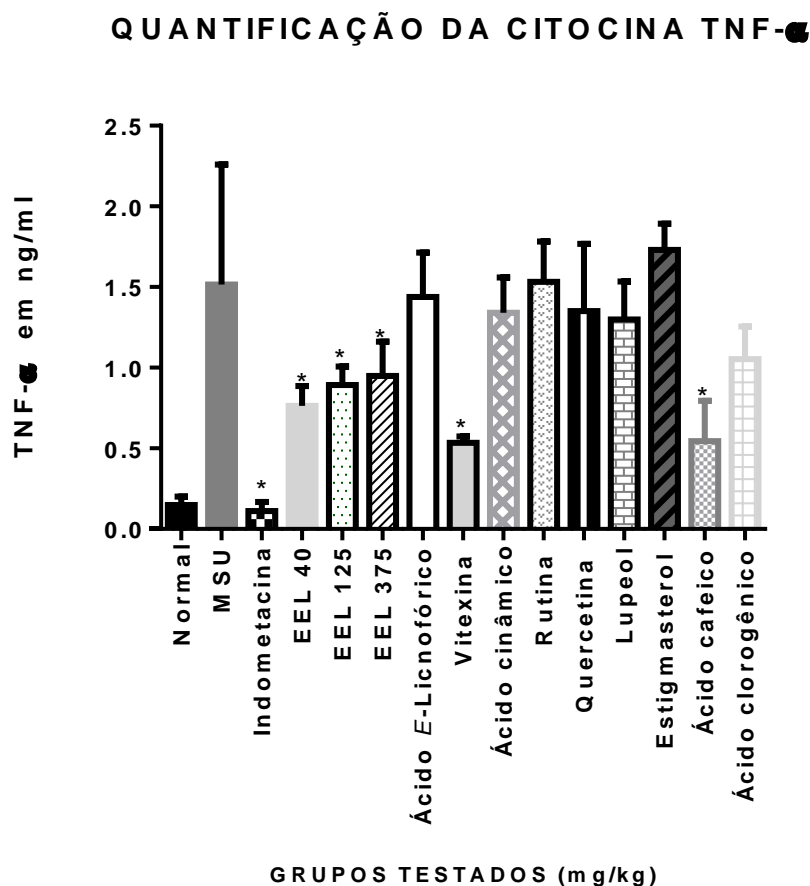


Figura 17: Efeitos do EEL, nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg, das principais substâncias presentes no EEL e da indometacina sobre a concentração da citocina TNF- α na cavidade periarticular da articulação fêmur-tibial (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em ng/mL após 6 horas de tratamento. *P < 0,05 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

8.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EEL E DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS PRINCIPAIS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO

8.3.1. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada após administração dos tratamentos com EEL, em três diferentes doses, e das substâncias majoritárias de *L. pinaster* aos camundongos com artrite induzida com injeção de MSU na articulação fêmur-tibial em camundongos C57BL/6. A vitamina C foi usada como antioxidante de referência. A atividade da SOD foi analisada

no tempo de 6 horas após indução da inflamação. Os resultados são demonstrados na (figura 18).

A vitamina C é um clássico antioxidante e por isso foi utilizado como controle positivo do experimento. Os efeitos produzidos pela vitamina C sobre a atividade da SOD quando comparado ao controle inflamado (MSU), como esperado, foram significativamente diferentes, pois suas características antioxidantes levou ao aumento da atividade da SOD.

O controle inflamado (MSU) encontra-se em uma situação basal, assim como o controle normal. Na comparação entre os grupos, em condições de inflamação como no caso da artrite, a atividade da SOD não é tão pronunciada como ocorreu no grupo tratado com vitamina C.

Os tratamentos com diferentes doses de EEL não promoveram aumento na atividade da SOD.

Os tratamentos com as principais substâncias presentes em *L. pinaster*, na dose de 15 mg/kg, mostraram que o ácido *E* – licnofórico e a vitexina apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle inflamado (MSU). Sendo assim, estas apresentam atividade antioxidante, atuando de forma a aumentar os valores da SOD (Figura 19).

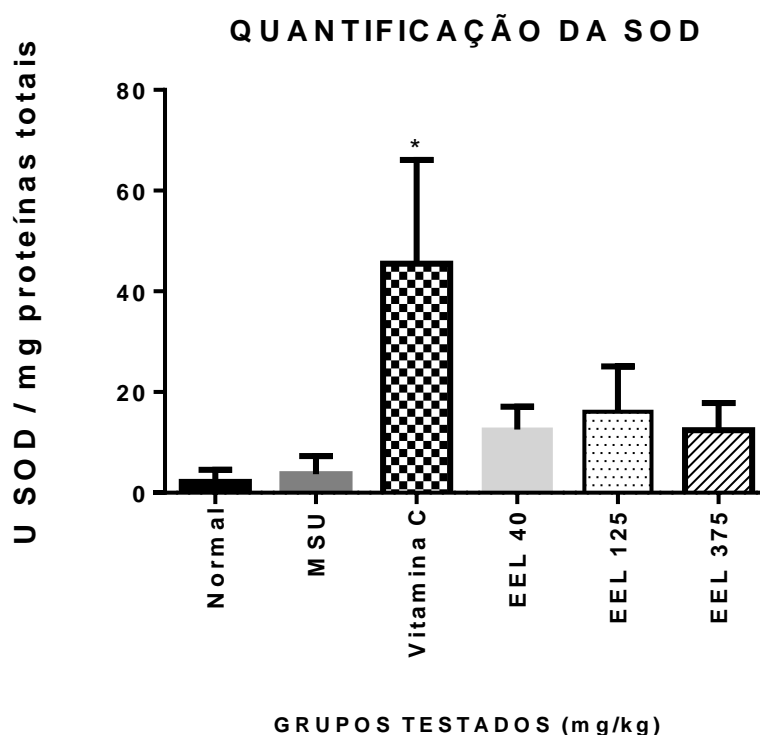


Figura 18: Comparação dos efeitos EEL nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg e da Vitamina C (250 mg/kg), composto antioxidante padrão, sobre a atividade da SOD (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em U SOD / mg de proteínas totais. *P < 0,05 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

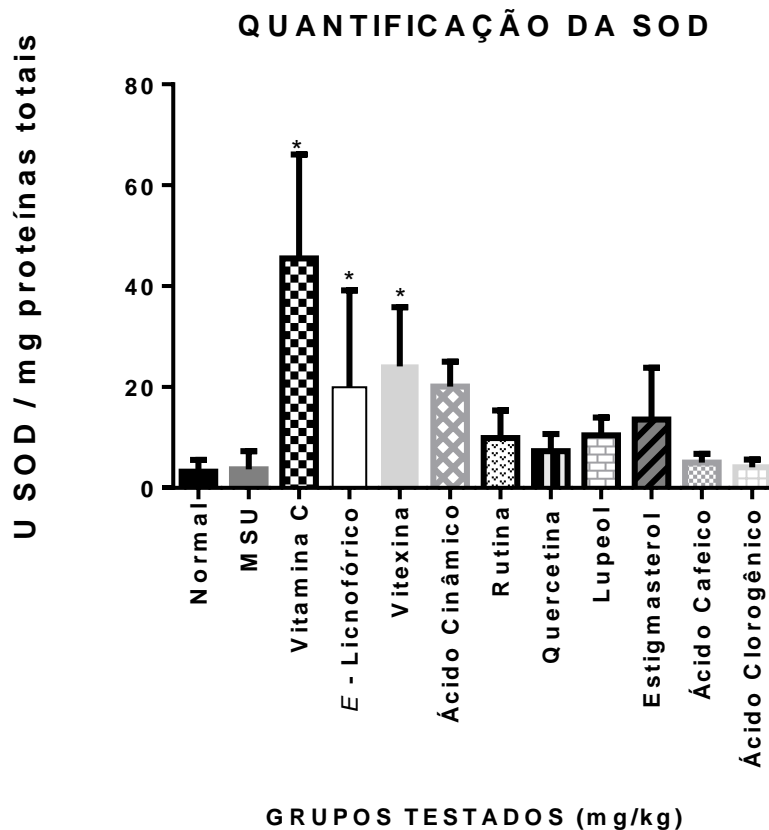


Figura 19: Efeitos das principais substâncias presentes no EEL, na dose de 15 mg/kg, e da vitamina C (250 mg/kg), composto antioxidante padrão, sobre a atividade da SOD (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em U SOD / mg de proteínas totais. *P < 0,05 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

8.3.3. Avaliação da atividade da enzima Catalase (CAT)

Quando se fala em CAT, automaticamente já se pensa em SOD, pois são duas enzimas que trabalham conjuntamente para regular o estresse oxidativo do organismo, e portanto, elas também devem ser analisadas conjuntamente.

Nos experimentos realizados pôde-se ver que os controles positivo (vitamina C), da inflamação (MSU) e normal encontram-se bem similares aos controles da SOD (**Figura 20**). Apenas o tratamento com o controle positivo, vitamina C, demonstrou diferença significativa quando comparado ao controle inflamado (MSU).

Os tratamentos com o extrato etanólico de *L. pinaster* nas doses de 40, 125, 375 mg/kg não demonstraram atividade significativa quando comparadas com o controle MSU, na atividade da enzima catalase (**Figura 20**).

Avaliando o efeito das substâncias: ácido *E*- lincofórico, vitexina, ácido cinâmico, rutina, quercetina, lupeol, estigmasterol, ácido cafeico e ácido clorogênico, na dose de 15 mg/kg, sobre a atividade da catalase (**Figura 21**), pôde-se observar que apenas o sesquiterpeno, ácido *E*- lincofórico apresentou diferença significativa com relação ao controle inflamado do experimento (MSU), demonstrando um efeito antioxidante por aumentar a CAT.

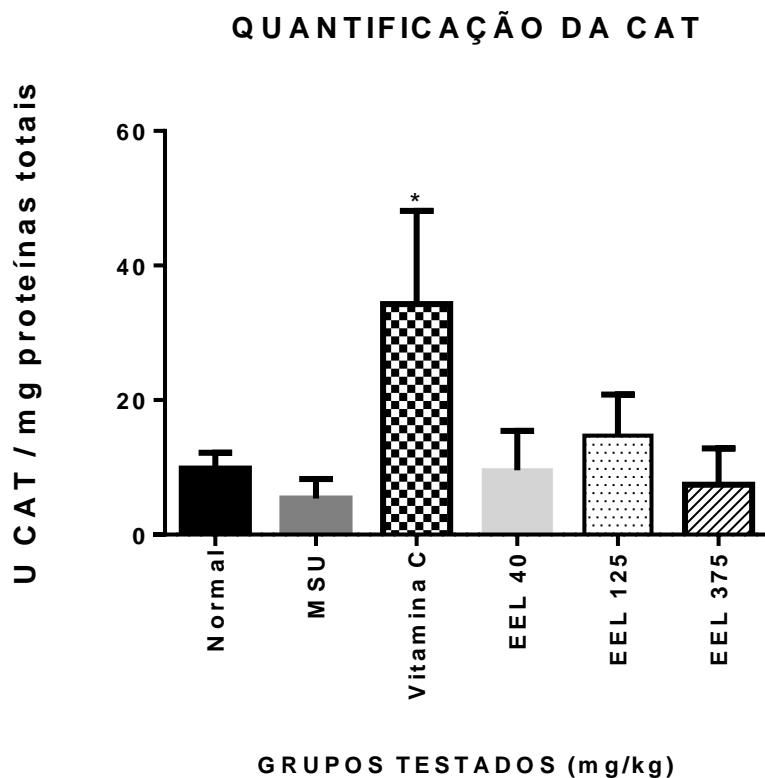


Figura 20: Efeito do EEL nas doses de 40, 125 e 375 mg/kg e da vitamina C (250 mg/kg), composto antioxidante padrão, sobre a atividade CAT (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em U CAT / mg de proteínas totais. *P < 0,05 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

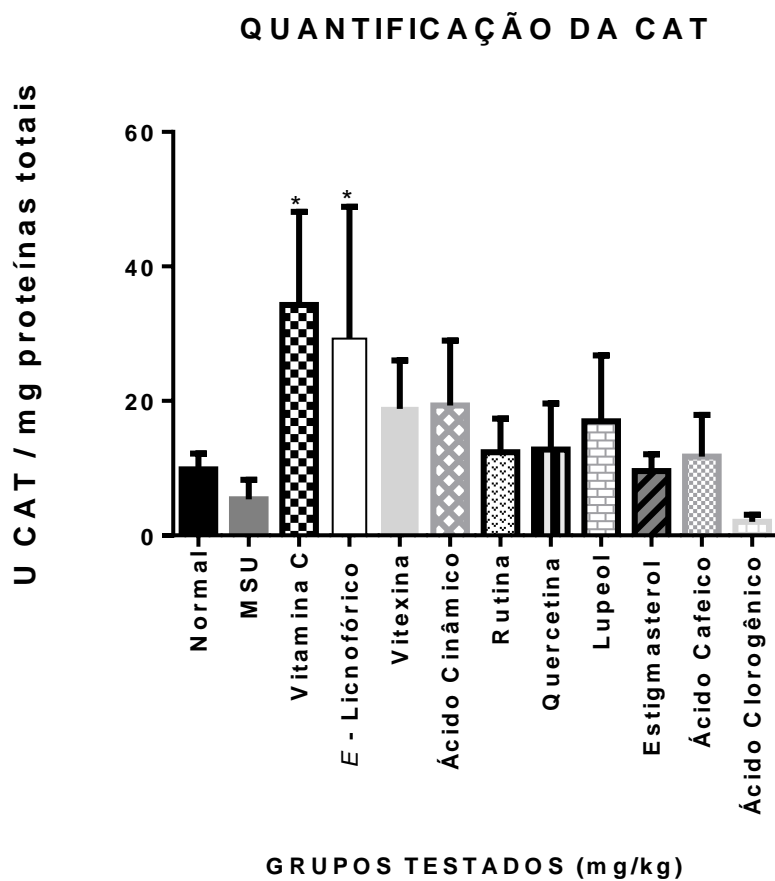


Figura 21: Efeito das principais substâncias presentes no EEL, na dose de 15 mg/kg, e da vitamina C (250 mg/kg), composto antioxidante padrão sobre a atividade da CAT (em camundongos C57BL/6) no modelo de artrite induzida por MSU. Os valores são representados em U CAT / mg de proteínas totais. *P < 0,05 em comparação ao controle MSU (n=6, ANOVA seguida de teste Dunnet).

Um resumo dos efeitos biológicos promovidos pelo EEL e substâncias é mostrado na **tabela 4**.

Tabela 4: Resumo dos efeitos do EEL e das principais substâncias deste extrato sobre a nocicepção, artrose gotosa e estresse oxidativo.

Substância	Dose	Antinocicepção	Diminuição da Migração de neutrófilos	Diminuição da concentração da IL - 1 β	Diminuição da concentração de TNF α	Aumento da Atividade da SOD	Aumento da Atividade da CAT
EEL 40	40 mg/Kg	N	S	S	S	N	N
EEL 125	125 mg/Kg	N	S	S	S	N	N
EEL 375	375 mg/Kg	S	S	S	S	N	N
Ácido <i>E</i> -licnofórico	15 mg/Kg	N	S	S	N	S	S
Vitexina	15 mg/Kg	N	S	S	S	S	N
Ácido cinâmico	15 mg/Kg	S	S	S	N	N	N
Rutina	15 mg/Kg	N	S	S	N	N	N
Quercetina	15 mg/Kg	S	S	N	N	N	N
Lupeol	15 mg/Kg	S	S	N	N	N	N
Estigmasterol	15 mg/Kg	S	S	S	N	N	N
Ácido cafeico	15 mg/Kg	N	S	S	S	N	N
Ácido clorogênico	15 mg/Kg	N	S	N	N	N	N
Indometacina	3 mg/Kg	S	S	S	S		
Vitamina C	250 mg/Kg					S	S

IL-1 β – Interleucina 1 β ; TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α ; SOD - Superóxido Dismutase; CAT - Catalase

9. DISCUSSÃO

A hiperuricemia leva a um quadro clínico que ocorre devido a alta produção ou baixa excreção de ácido úrico, e é o primeiro passo para o desenvolvimento da gota. A insuficiência renal tem papel predominante no surgimento da hiperuricemia, pois ela acomete 90% dos pacientes hiperuricêmicos (Álvarez-Lario e Alonso-Valdivielso, 2014). Dessa forma, pacientes com baixa excreção de ácido úrico utilizam fármacos com atividade uricosúrica, tais como benzbromarona, sulfipirazona e probenecida, que apesar de possuírem efeitos adversos graves, são eficientes na sua ação. Em casos de hiperuricemia e na gota crônica também são utilizados fármacos que agem no controle dos níveis de ácido úrico serico, denominados uricostáticos. O alopurinol e o febuxostate, possuem muitos efeitos adversos graves, porém são as únicas escolhas de tratamento para este fim. Entretanto o febuxostate é um fármaco cujo uso não foi liberado no Brasil (Murugaiyah e Chan, 2009).

Quando a concentração de ácido úrico no sangue ultrapassa 6,8 mg/dl, este pode se depositar, na forma de cristais de urato monossódico (MSU), em articulações, tecidos subcutâneos ou rins (Tausche et al., 2009). A lesão ocasionada pelo MSU ativa o inflamassoma NLRP3, que faz a tradução da citocina pró-IL-1 β . Porém ela só terá atividade após ser clivada pela protease caspase 1, sendo convertida em IL-1 β (Borghetti, 2013; Ramonda, 2015). Após sua ativação ela será liberada para o meio extracelular (Martinon, 2002; Mariathasan, 2004). Os altos níveis de IL-1 β tem a função de sinalizar os nociceptores, sensibilizando-os de forma a gerar a dor inflamatória e assim o sistema de defesa do organismo (Martinon et al., 2006; Ren e Dubner 2010). Conseqüentemente, há síntese e liberação de vários mediadores, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , enzimas (COX-2 e INOS), moléculas de adesão, entre outros, que irão iniciar o reparo da lesão causada pelo MSU, inicialmente, recrutando e ativando a infiltração de neutrófilos no tecido afetado (Coutinho et al., 2009). Estes, por meio de sinais quimiotáticos, atraem mais células de defesa para o local da inflamação, como monócitos, células dendríticas, macrófagos (Nathan, 2006). Essa alta concentração de células, também aumenta a respiração celular, pois há maior absorção de oxigênio. Desta forma são formadas espécies reativas do oxigênio, como por exemplo o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila que causam um desequilíbrio entre sua produção e os metabólitos reativos, gerando o estresse oxidativo (Reuter et al., 2010). Este desequilíbrio é prejudicial as células, causando danos ao organismo como um todo (Durackova, 2010).

O organismo humano possui um complexo sistema antioxidante, que o protege dos radicais livres, que são produzidos constantemente no metabolismo normal, e, também, em casos de patógenos no sistema. Porém, quando esse sistema por algum motivo entra em desequilíbrio, é desencadeado o estresse oxidativo (Machado et al., 2009). Então, para reestabelecer o seu funcionamento normal, algumas enzimas antioxidantes passam a atuar, tais como GSH, SOD, CAT, GPx, GR, além de algumas vitaminas, como a vitamina E e o ácido ascórbico (Ferreira e Matsubara, 1997).

A artrite gotosa é uma doença crônica, altamente destrutiva, que não possui cura e apresenta fases severas de crise aguda. Além disso, a sua terapia medicamentosa não é completamente eficiente, e apesar de controlar os sintomas, ela também possui efeitos adversos severos (Lima, 2014). Na crise aguda da gota, o uso de AINES, é o tratamento de primeira escolha (Azevedo et al., 2017). Em alguns casos são usados corticoides e colchicina, alcaloide natural obtido da espécie *Colchico autumnale* L. (Roberts, 1987).

A indometacina é um anti-inflamatório da classe dos AINES, que também exerce função antipirética e analgésica, usada em diversas situações, como por exemplo no alívio da dor, na tumefação e dores articulares (Brunton et al., 2010). No entanto, os AINES podem ocasionar insuficiência cardíaca e renal, aumento da pressão arterial, acidente vascular cerebral (AVC) e risco de infarto do miocárdio (Batlouni, 2010).

Assim, a busca por novas opções para o tratamento da artrite gotosa é relevante. Os dados obtidos no presente estudo mostraram os efeitos produzidos pelo extrato etanólico da *L. pinaster* e de seus principais constituintes químicos na artrite gotosa, inflamação e dor.

Na literatura há diversos produtos naturais que se mostraram potencialmente eficazes para o tratamento da inflamação e gota. Estudo realizado por Guzzo e colaboradores (2008), demonstrou a atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *L. pinaster* (750 mg/kg) no modelo de contorções induzidas por ácido acético e no modelo de placa quente, além de efeito antiedematogênico no edema de pata induzido por carragenina (Guzzo et al., 2008).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Müller, 2017), o extrato etanólico de *L. pinaster* e os componentes químicos principais deste extrato, com exceção da quercetina e da rutina, promoveram efeito antiedematogênico no modelo do edema de pata induzido por MSU em camundongos Swiss (Müller, 2017). O ácido *E*-licnofórico (15 mg/kg) foi o que apresentou a melhor atividade, seu efeito foi equivalente ao da indometacina nos tempos de 24, 48 e 72 h após a indução do edema. A Rutina, lupeol,

estigmasterol e os ácidos clorogênico e cafeico (15 mg/kg) também se mostraram ativos no modelo de edema de pata induzido por MSU (Müller, 2019).

No presente trabalho, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *L. pinaster* (EEL) e das principais substâncias isoladas desta espécie foram avaliadas em camundongos C 57 Black 6 com artrite gotosa induzida pela injeção intra-articular de MSU. O tratamento dos animais foi feito com EEL (40,125,375 mg/kg) e com rutina, quercetina, lupeol, estigmasterol, vitexina e com os ácidos *E*-licnofórico, cinâmico, clorogênico e cafeico na dose de 15 mg/kg por via oral.

EEL apresentou atividade antinociceptiva na maior dose avaliada. As substâncias responsáveis por esse efeito foram o ácido cinâmico, quercetina, lupeol e estigmasterol. Entre as substâncias presentes em EEL, o lupeol foi a que proporcionou melhor resultado antinociceptivo, sendo seu efeito superior ao da indometacina (controle positivo). Estudos *in vitro*, mostraram que lupeol foi capaz de inibir a liberação de PGE-2 (Fernandez et al., 2001). O ácido aracdônico presente nas células sofre ação das ciclooxigenases (COXs) e da prostaglandina E sintase terminal (PGES) para sua conversão à PGE-2. Esta prostaglandina tem importante papel na inflamação de doenças como artrite reumatóide e artrose (Park et al., 2006).

No teste da dor induzida por formalina, a quercetina aumentou o tempo que o animal levou para lambar a pata (Willain Filho et al., 2008). Além disso, quercetina foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina (Morikawa et al., 2003).

A migração de neutrófilos também foi avaliada na fase aguda da artrite gotosa, no tempo de 6 horas após injeção de MSU na cavidade periarticular. O tratamento com EEL, nas três doses, reduziu a migração de neutrófilos, porém a melhor dose foi a de 125 mg/kg, não produzindo efeito dose-dependente. Além do mais, EEL, nas três doses, reduziu a concentração das citocinas IL-1 β e TNF- α no tecido periarticular, comportando-se de forma dose-dependente na dosagem do TNF- α . Assim, EEL demonstrou atividade antinociceptiva e antiartrite por inibir a migração de neutrófilos e reduzir as concentrações de IL-1 β e TNF- α na articulação.

Em relação as substâncias presentes na *L. pinaster*, todas inibiram a migração de neutrófilos para a região periarticular.

Em estudos prévios de Hebeda (2011), o ácido clorogênico inibiu a migração de neutrófilos em ensaios sobre funções de neutrófilos *in vitro*, incubados com ácido clorogênico e LPS de *Escherichia coli* (Hebeda et al., 2010).

Quando há inflamação aguda, as respostas iniciais de defesa do organismo são elementos da imunidade inata, como lesão tecidual e celular, aumento da permeabilidade

vascular e migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos e macrófagos (Curvinel et al., 2010). Sendo assim, o extrato etanólico e substâncias avaliadas se mostraram capazes em reduzir a concentração de neutrófilos no local inflamado e, conseqüentemente, apresentaram atividade anti-inflamatória.

O processo inflamatório da gota é caracterizado pela infiltração de cristais de urato monossódico (MSU) nas articulações de pacientes hiperuricêmicos. Macrófagos fagocitam esses cristais de ácido úrico formando o inflamassoma, que resulta na clivagem da caspase-1, maturação e liberação de IL-1 β . Quando a IL-1 β ativa seus receptores, na sequência quimiocinas são liberadas e neutrófilos são recrutados para a articulação afetada. Dessa forma, potencializa a inflamação, acometendo o tecido, causando danos, disfunção e dor na articulação (Amaral et al., 2016). Devido a este fato foi importante compreender alguns dos mecanismos pelos quais as principais substâncias presentes em EEL desempenharam na inflamação da artrite.

Como houve diminuição da concentração de IL-1 β na região onde a inflamação foi induzida, podemos sugerir que os tratamentos com EEL inibiram a produção de IL-1 β , dessa forma não houve ativação dos receptores para a liberação dos neutrófilos, já que os mesmos permaneceram em baixas concentrações na cavidade articular durante o tratamento. Na avaliação da dosagem de IL-1 β , apenas os tratamentos com rutina, estigmasterol, vitexina e com os ácidos *E*-licnofórico, cinâmico e cafeico diminuíram a concentração da IL-1 β , tendo a vitexina efeito similar ao da indometacina.

O grupo de animais tratados com quercetina apresentou concentração de IL-1 β ainda maior que o controle inflamado, porém esse fato se justifica pela sua baixa biodisponibilidade oral em camundongos (Rabelo, 2017). Experimentos *in vitro* realizados com a quercetina mostraram que esta promoveu a redução da produção de NO e TNF- α em modelo celular de mastócitos humanos (Park et al., 2008). No presente estudo, o tratamento com quercetina, *in vivo*, não reduziu a concentração de TNF- α . Os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório apresentados por ela foram decorrentes da inibição da migração de neutrófilos e redução da concentração de IL-1 β no tecido periarticular.

Rosa e colaboradores (2016) demonstraram a eficácia da vitexina (5, 15 e 30 mg/kg) na redução da peritonite induzida em camundongos. Vitexina inibiu a migração de neutrófilos e reduziu a liberação de IL-1 β , TNF- α e NO por macrófagos RAW 267.4 (Rosa et al., 2016). Em nosso trabalho, os tratamentos com vitexina e ácido cafeico diminuíram a concentração do TNF- α na cavidade periarticular dos camundongos, sem diferenças significativas em relação à indometacina (controle positivo).

O efeito anti-inflamatório do lupeol (25 mg/kg), administrado por via oral, sobre o edema de pata induzido em camundongos por MSU foi demonstrado em estudos prévios conduzidos por de Souza e colaboradores (2012), (de Souza et al., 2012). No presente trabalho, lupeol foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos. No entanto, não reduziu as concentrações de IL-1 β e TNF- α no tecido periarticular, indicando que um dos mecanismos pelo qual exerceu os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório foi pela inibição da migração de neutrófilos e não por ação sobre estas citocinas. Estudos *in vitro* realizados por Fernandez et al., (2001), mostraram que lupeol foi capaz de inibir a liberação de IL-1 e TNF- α . No entanto, nos experimentos *in vivo* realizados neste trabalho esses resultados não foram confirmados.

O estresse oxidativo está inteiramente relacionado ao processo inflamatório, pois quando os neutrófilos são recrutados para o local da lesão eles liberam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, as chamadas EROS e ERN, respectivamente (Siti et al., 2015). Sendo assim, foi objetivo desse trabalho avaliar a influência dos tratamentos com EEL e seus principais constituintes químicos sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, no tecido periarticular após 6 horas de injeção intra-articular de MSU em camundongos.

SOD e CAT são enzimas complementares, pois elas atuam juntas no estresse oxidativo e protegem o organismo de futuras lesões. A SOD dismuta o radical superóxido, produto oxigenado produzido pela respiração aeróbica em organismos vivos, em peróxido de hidrogênio e oxigênio. E então a CAT entra com sua ação de dismutar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, amenizando o estresse oxidativo causado em situações de inflamação (Barbior, 1997).

Como resultado do experimento, a pesquisa de atividade da SOD no grupo controle da inflamação (MSU) encontra-se em uma situação basal, assim como o controle normal, o que pode ser explicado por várias hipóteses:

1- A ação de pró-oxidantes, que são substâncias que induzem o estresse oxidativo por meio de espécies reativas de oxigênio ou pela inibição dos sistemas antioxidantes, e dessa forma agem como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Existem vários pró oxidantes que atuam ativando um fator de transcrição chamado NRF2. O NRF2 migra para o núcleo celular e ativa a transcrição de enzimas antioxidantes, por exemplo SOD e CAT. Porém esse mesmo fator de transcrição também ativa enzimas oxidantes, agindo de forma dual (Day, 2014; Lushchak, 2014).

Quando ocorre esse estímulo estressor, ele pode agir com intensidades variadas, sendo muito intenso, médio ou baixo, o que irá determinar a ação diferencial dessas enzimas antioxidantes (Day, 2014; Lushchak, 2014).

Normalmente, o processo inflamatório irá aumentar as enzimas antioxidantes pela resposta adaptativa. Entretanto, neste caso, o agente estressor (MSU) pode ter sido tão intenso que inibiu a atividade da enzima SOD por modificação pós traducional, ou seja, houve deslocamento da NFR2 e aumento da transcrição e tradução da SOD, porém a proteína não ficou ativa.

O estímulo estressor intenso causado pelo MSU pode ser explicado pela lesão tecidual causada pela injeção intra-articular juntamente com a ação oxidante ocasionada pelo próprio MSU, pois lesão tecidual associada a sangramentos liberam hemoglobina e ferro, que são agentes que promovem acúmulo de substâncias oxidantes (Ferreira e Matsubara, 1997).

2 - A segunda hipótese pode estar relacionada à deficiência de alguns fatores para ação normal da SOD. Neste caso, dosamos SOD total (SOD zinco, SOD manganês, SOD mitocondrial, SOD citosólica) e os diferentes tipos de SOD dependem de vários fatores, como íons e minerais para ser ativada. Então qualquer desequilíbrio nesses íons e minerais na biologia dos camundongos, pode afetar a ativação da enzima SOD (Barbior, 1997; Ferreira et al., 1997).

3 - Outra proposta é o tempo de administração do estressor, que pode ter afetado as respostas antioxidantes. Neste experimento o período de inflamação foi de 6 horas, considerando uma inflamação aguda, e este curto tempo pode não ter sido suficiente para o organismo do camudongo ter uma resposta adaptativa.

Além dessas hipóteses citadas é necessário atentar-se que o sistema de defesa antioxidante é muito amplo, pois há outras enzimas que também atuam nesse processo, como a glutathiona (GSH), que age em parceria com a glutathiona peroxidase (GPx ou GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR ou GSH-Rd). Também o metal selênio tem grande importância no estresse oxidativo, agindo na enzima (seleno-cisteína) para catalisar a dismutação do peróxido (Barreiros et al., 2006).

No resultado do experimento da CAT seus controles, controle da inflamação (MSU) e normal encontram-se em uma situação basal, assim como os controles normal e inflamado da SOD, que podem ser explicados de forma similar:

1- A ação estressora foi tão intensa que inibiu a atividade da enzima CAT por modificação pós traducional, ou seja, houve deslocamento da NFR2 e aumento da transcrição e tradução da CAT, porém a proteína não ficou ativa (Day, 2014; Lushchak, 2014);

2- Uma possível deficiência na atividade de NADPH, pois este é necessário para a ativação da enzima CAT (Ferreira e Matsubara, 1997);

3- O estímulo estressor intenso ocasionado pelo MSU, juntamente com a lesão tecidual causada pela injeção intra-articular associada a ação oxidante gerada pelo próprio MSU, levou a lesão tecidual com conseqüente sangramento, liberando hemoglobina e ferro, que são agentes que promovem acúmulo de substâncias oxidantes (Ferreira e Matsubara, 1997);

Porém mesmo esses dois controles (MSU e normal) comportando-se nessas condições, o controle positivo referênte a vitamina C, se comportou com atividade antioxidante tanto sob a SOD, quanto sob a CAT, como registrado em estudos anteriores (Barbosa et al., 2010), validando o modelo experimental.

No caso da quercetina, que possui capacidade antioxidante bem descrita na literatura e comprovada ação no aumento da atividade da SOD e CAT em experimentos *in vitro*, quando administrada em camundongos por via oral, demonstrou possuir baixa biodisponibilidade. Este fato justifica os resultados obtidos no presente estudo, onde o tratamento com quercetina não promoveu atividade antioxidante em relação a SOD e CAT nos experimentos *in vivo* quando comparado ao valor do controle MSU (Rabelo, 2017).

A capacidade antioxidante foi desempenhada apenas pelo controle positivo (vitamina C), ácido *E*-licnofórico e vitexina. No entanto, a vitexina, aumentou as concentrações de CAT e o ácido *E*-licnofórico as de SOD e CAT no tecido periarticular. Considerando que a enzima SOD tem a função de formar o peróxido de hidrogênio e a CAT pela sua degradação, deve-se analisá-las em conjunto. O ácido *E*-licnofórico apresentou melhor atividade antioxidante em relação à SOD-CAT. No caso da vitexina pode-se considerar que sua atividade antioxidante também foi efetiva em aumentar CAT, mas não aumentou as concentrações de SOD. Desta forma, como a função da CAT é degradar o peróxido de hidrogênio, supõe-se que a conversão de espécies reativas do oxigênio pode ter sido feita por outra enzima antioxidante como a glutatona oxidase, que tem a função de converter o oxigênio em peróxido de hidrogênio. E atuando junto a glutatona oxidase a vitexina pode ter promovido a ação de neutralizar o peróxido de hidrogênio convertendo-o em água, devido ao aumento das concentrações de CAT no experimento.

Corroborando com os resultados deste estudo, o flavonoide vitexina demonstrou capacidade antioxidante significativa em ensaios *in vitro* de ácido tiobarbitúrico (TBA) e,

também, mostrou efeito protetor sobre o estresse por peróxido em *Escherichia coli* desenvolvidos por Zhang e colaboradores, (2014) (Zhang et al., 2014).

O controle positivo (vitamina C) aumentou as concentrações tanto de SOD como de CAT, comprovando seu efeito antioxidante.

Em estudos realizados *in vitro* por Sato e colaboradores, (2010), o ácido cafeico e o ácido clorogênico mostraram capacidade antioxidante em ensaios do tipo desempenho antioxidante total (TAP) (Sato et al., 2010). Porém, estas duas substâncias não apresentaram capacidade de aumentar a SOD e CAT no experimento *in vivo* deste trabalho.

No presente trabalho os efeitos de EEL e de suas principais substâncias sobre a artrite gotosa foram demonstrados pela primeira vez no modelo usado. Este modelo experimental mostrou-se enriquecedor, pois foi capaz de avaliar diversas ações farmacológicas e também foi capaz de demonstrar alguns mecanismos de ação do EEL e das substâncias de *L. pinaster* em doses menores das quais já foram avaliadas na literatura.

O tratamento atual da gota mostra-se eficaz, porém são reduzidos e com alto grau de efeitos adversos, por isso este trabalho pôde proporcionar resultados que fazem da espécie *L. pinaster* uma alternativa para aumentar o arsenal terapêutico da gota, juntamente com possibilidades futuras de um tratamento com maior eficácia na terapia da inflamação e dor.

10. CONCLUSÃO

A gota é uma doença que apesar de ter alguns tratamentos pré-estabelecidos, eles ainda se mostram inadequados devido ao alto grau de efeitos adversos, a hipersensibilidade de alguns pacientes aos medicamentos usados e a baixa adesão dos pacientes à terapia. Sendo assim, a obtenção de novos protótipos de fármacos e fármacos a partir de plantas e de novos fitoterápicos aumentariam o arsenal terapêutico para o tratamento da gota e as chances de maior adesão ao tratamento.

No presente estudo o EEL apresentou atividade antinociceptiva e antiartrite gotosa por inibir a migração de neutrófilos e reduzir as concentrações de IL-1 β e TNF- α na região inflamada, indicando seu efeito sobre a redução da produção destas citocinas. O ácido cinâmico, quercetina, lupeol e estigmasterol foram as substâncias presentes em EEL responsáveis pelo efeito antinociceptivo apresentado pelo extrato. Rutina, quercetina, vitexina, lupeol, estigmasterol e os ácidos *E*-licnofórico, cinâmico, cafeico e clorogênico são os constituintes responsáveis pela atividade do extrato na antiartrite gotosa.

Em relação à atividade antioxidante, apenas as substâncias vitexina e ácido *E*-licnofórico aumentaram a atividade das enzimas SOD e CAT no tecido periarticular da articulação fêmur tibial. Apesar dos efeitos apresentados por estas substâncias no estresse oxidativo, o EEL não mostrou nenhum efeito antioxidante.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram o potencial do extrato etanólico de partes aéreas de *L. pinaster* e das substâncias presentes nesse extrato para o tratamento da dor e inflamação decorrentes da artrite gotosa.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J., BERMEJO, P., VALVERDE, S., VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. **Planta Medica**, v. 60, p. 228-231, 1994.

Abbas, A.K., Lishtman, A.H., Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 8 ed., 1262 f., 2015.

ABREU, V.G.C. Estudo fitoquímico e biológico das folhas, caule e flores de *Lychnophora pinaster* Mart.. **Dissertação** (Mestrado) – Curso de química. 134 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 01-104, 2009.

ABREU, V. G. C.; CORREA, G. M.; SILVA, T. M.; FONTOURA, H. S.; CARA, D. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 270, p. 2-8, 2013.

ABREU, V. G. C.; TAKAHASHI, J. A.; DUARTE, L. P.; PILÓ-VELOSO, D.; JÚNIOR, P. A. S.; ALVES, R. O.; ROMANHA, A. J.; ALCÂNTARA, A. F. C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 615-621, 2011.

AEBI, H. Catalase in vivo. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-26, 1984.

AMARAL, F. A., BASTOS, L. F. S., OLIVEIRA, T. H. C., DIAS, A. C. F., OLIVEIRA, V. L. S., TAVARES, L. D., TEIXEIRA, M. M. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 1, p. 204–211, 2016.

ALVES, J.E.O.; SILVEIRA, M.D., VIEIRA, E.M.P.; VIDAL, L.W.M. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases na analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta- Biomedica Brasiliensia**, v. 8, n.1, p. 56-68, 2017.

ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVEIRA, D.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; GUIMARÃES, J. E.; RASLAN, D. S. Comparative analysis of the trypanocidal activity and chemical properties of *E*-lychnophoric acid and its derivatives using theoretical calculations. **Eclética Química**, v. 30, n. 3, p. 37-45, 2005.

ANTONISAMY, P.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 63, n. 8, p.1070-1077, 2011.

AREND, W. P., MALYAK, M., GUTHRIDGE, C. J., & GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review of Immunology**, v.6, p. 27–55, 1998.

AZEVEDO, V. F.; LOPES, M. P.; CATHOLINO, N. M.; PAIVA, E. S.; ARAÚJO, V. A.; PINHEIRO, G. R. C. Revisão Crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 57, n. 4, p. 346-355, 2017.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n.4, p. 556–563, 2010.

BARBOSA, P.H., CARNEIRO, F., MARTELLI, A., & TRIGO, E.L. Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. **Archives of health investigation**, v.7, n. 3, p. 91-95, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BACH, M. H.; SIMKIN, P.A. Uricosuric drugs: the once and future therapy for hyperuricemia? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, p.75-92, 2014.

BAZON, J. N., LOPES, J. L. C., VICHNEWSKI, W., DIAS, D. A., NAGAMITI, K., CUNHA, W. R.; HERZ, W. Cadinanes and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*, **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p.1535-1536, 1997.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. Processo inflamatório. Jaboticabal, SPUNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006. **Disponível em:** http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf , 9 de Maio de 2019.

BEDBROOK, G.M - Injuries of the Thoracolumbar Spine with Neurological Symptoms, em: Vinken PJ, Bruyn GW. **Handbook of Clinical Neurology Amsterdam**, v. 25, p.437- 466, 1976.

BESSON, J.M., CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 67-186, 1987.

BOHLMANN, F. e JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the *Vernoniae* (*Compositae*). **Plant Systematics Ecology**, v. 4, p. 3-43, 1990.

BOHLMANN, F., MOLLER, L. KING, G, R.M., ROBINSON, H. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora species*. **Phytochemistry**, v.20, n.5, p.1149-1151, 1981.

BORELLA, J.C., LOPES, J.L.C., VICHNEWSKI, W., IT COINS, W.R. AND HERZ, W. Sesquiterpenes lactones, triterpenes and flavones of *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora Pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p.671-676, 1998.

BORGHI, S.M. Participação das citocinas TNF α , IL-1 β e IL-10 em modelo de dor muscular de início tardio (DMIT) em camundongos – modulação pela pentoxifilina e talidomida. **Dissertação** (Doutorado) – Curso de patologia experimental. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 281 f, 2013.

BORSATO, M.L.C., GRAEL, C.F.F., SOUZA, G.E.P, LOPES, N.P. Analgesic action of lignans of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.809-813, 2000.

BRASIL, LEIS E DECRETOS - RDC no. 232 de 17 de agosto de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, estabelece inclusão da substância COLCHICINA no anexo I – Substância de Baixo Índice Terapêutico. DOU de 18 de agosto de 2005. Acesso em <http://femerj.org.br/boletim/federal/Ministerio%20Saude/ANVISA/2005/Agosto/RESOLU%C3%87%C3%83O%20RDC%20N%C2%BA%20232Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%BAde.pdf>. Acesso em 15 de julho de 2019.

BRAZ, J., SOLORZANO, C., WANG, X., & BASBAUM, A. Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. **Cell Press: Neuron**, v.82, p. 522-536, 2014.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH Editora, v.10, p. 605-606, 2010.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors and pain. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 15, p. 17-35, 2009.

CARSWELL, E.A., OLD, I.J., KASSEL, R.L., GREEN, S., FIORE, N., WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 3366-3370, 1975.

CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; AMADO JÚNIOR, R.; PEIXOTO, A. B. F. **Ciência e Cultura** 39, v. 5/6, p. 551-553, 1987.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; & COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

CUNHA, W.R. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora rupestres* SEMIR & LEITÃO FILHO (Verminoniae, Compositae). **Tese** (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 166 f. ,1994.

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

CHIARI, E., OLIVEIRA, A. B., et al. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.372-374, 1991.

CHOI, H.K, ATKINSON, K., KARLSON, E.W., WILLETT, W., CURHAN, G. Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study. **Lancet**, v. 363, p.1277–81, 2004.

CHOI, H.K., CURHAN, G. Independent impact of gout on mortality and risk for coronary heart disease. **Circulation**, v. 116, p. 894–900, 2007.

CRUVINEL, W.M., MESQUITA, D.J., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W., SILVA, NP, ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário - Parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434–461, 2010.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.

DAY, B.J. Antioxidant therapeutics: Pandora's box. **Free Radical Biology and Medicine**, USA, v. 66, p. 58-64, 2014.

DE OLIVEIRA, C. M. B., SAKATA, R. K., ISSY, A. M., GEROLA, L. R., & SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

DE SOUZA, M. R., DE PAULA, C. A., PEREIRA DE RESENDE, M. L., GRABE-GUIMARÃES, A., DE SOUZA FILHO, J. D., & SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, n. 3, p. 845–850, 2012.

DIETERICH, S., BIELIGK, U., BEULICH, K. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v.101, p.33-39, 2000.

DUARTE, D. S., RASLAN, D. S., CHIARI, E., OLIVEIRA, A. B. Trypanocidal activity of *Lychnophora pinaster* Mart. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 88-240, 1993.

DUARTE, D. S. Estudo químico biomonitorado de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) e de *Macfadyena unguis-cati* (L.) A Gentry (Bignoniaceae). **Tese** (Doutorado) – Curso de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 177 f., 1999.

DUBCHACK, N., FALASCA, G.F. New and improved strategies for treatment of gout. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 3, p. 145-166, 2010.

EDWARDS, N.L., SO, A. Emerging Therapies for Gout. **Rheumatism Disease Clinics**, v. 40, p. 375-387, 2014.

EL-TANTAWY, W. H. Natural products for the management of hyperuricaemia and gout: a review. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–12, 2009.

FATTORI, V. Mecanismos de inibição da inflamação e dor pela curcumina nos modelos de artrite induzida por dióxido de titânio e inflamação induzida por ânion superóxido em camundongos. **Dissertação** (Mestrado) – Curso de Patologia experimental, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 129 f., 2016.

FEIN, A. Nociceptores: As células que sentem dor. University of Connecticut Health Center Farmington. 2012, 93 p. Disponível em <http://www.dol.inf.br/nociceptores>.

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

FERRAZ-FILHA, Z.S.; FERRARI, F.C.; ARAÚJO, M.C.D.P.M, BERNARDES, A.C.F.P.F.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Effects of the Aqueous Extract from *Tabebuia roseoalba* and

Phenolic Acids on Hyperuricemia and Inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-10, 2017.

FERNANDES, A.C., FERREIRA BERNARDES, P., COELHO, G.B., CAROLINA DE PAULA, M., ARAÚJO, M., & ANTUNES SAÚDE-GUIMARÃES, D. Model In vivo anti-hyperuricemic activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2018.

FERNÁNDEZ, M.A., DE LAS HERAS, B., GARCIA, M.D., SÁENZ, M.T., VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 53, p. 1533–1539, 2001.

FERRARI, F.C. Estudo fitoquímico da fração acetato de etila, avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* e da toxicidade em camundongos de *Lychnophora trichocarpa spreng*. **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 140 f., 2008.

FERRARI, F.C.; FERREIRA, L.C.; SOUZA, M.R.; GRABE-GUIMARAES, A.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactones from Spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy Research**, v. 27, n.3, p. 384-389, 2013.

FERREIRA, A. A.; AZEVEDO, A. O.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA, P. M.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituents of *Lychnophora pinaster* hydroalcoholic extract. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 4, p. 466, 2005.

FERREIRA, S. A. Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (Arnica). **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Ouro Preto, 147 f., 2010.

FERREIRA, S.A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; ASSIS, N.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Efeitos anti-inflamatório tópico e antinociceptivo do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (Arnica Brasileira). **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.1, n.1, p. 26-39, 2019.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, L. C., GRABE-GUIMARÃES, A., DE PAULA, C. A., MICHEL, M. C. P., GUIMARÃES, R. G., REZENDE, S. A., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100–108, 2013.

FRANÇOIS, G., PASSREITER, C. M., WOERDENBAG, H. J., VAN LOOVEREN, M. Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. 1986. **Planta Medica**, v.62, p.126-129, 1996.

GRANDI, T.S.M., TRINDADE, J.A., PINTO, M.J.F., FERREIRA, L.L. & CATELLA, A.C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica, Suplemento**, v. 3, p.185-224, 1989.

GIESBRECHT, A.M., DAVINO, S.C., NASSIS, C.Z. YOUNG, M.C., LOPES, J.L.C., RODRIGUES, D.C., VICHNEWSKI, W., NASI, A.M.T.T., DIAS, D.A., LOPES, J.N.C. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. **Química Nova**, v.13, p. 312-314, 1990.

GIULIETTI, A.M., PIRANI, J.R. Patterns of geografic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas gerais and Bahia, Brazil. In: HEYER W.R.; VANZOLINE, P.E. (Eds.) Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns, **Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências**, p. 39-69, 1988.

GOBBO-NETO, L., SANTOS, M.D., ALBARELLA, L., ZOLLO, F., PIZZA, C., LOPES, N.P. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *lychnophora ericoides* Mart (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 473-475, 2008.

GRAEL, C.F.F., ALBUQUERQUE, S., LOPES, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v.76, p.73-82, 2005.

GUERRERO, A.T.G., VERRI, W.A., CUNHA, T.M., SILVA, T.A., SCHIVO, I.R.S., DAL-SECCO, D., FERREIRA, S.H. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE 2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 122–130, 2007.

GUZZO L. S., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 120-124, 2008.

GUZZO, C.A., LAZARUS, G.S., WERTH, V. Dermatological Pharmacology. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GILMAN, A. G. (Org.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis phytotherapeutics**, New York: McGraw-Hill, v. 9, p. 1604-6, 1996.

HAYDEN, M.S., WEST, A.P., GHOSH, S. NF-kB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6758–6780, 2006.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p.481-504, 2000.

HEBEDA, C.B., BOLONHEIS, S.M., NAKASATO, A., BELINATI, K., SOUZA, P.D.C., GOUVEA, D.R., FARSKY, S.H.P. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 261–269, 2011.

HECKLER A.M.; WUST B.U.; BONA LIBARDONI, K.S.; OLIVEIRA T.B. Gota: uma revisão da literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde Biológicas**, v. 1, n. 1, p.52-64, 2017.

HOCHBERG, et al. Rheumatology. **Elsevier**, v. 6, 2015.

IASP – Internacional Association for the Study of Pain. **Pain**, v.3, p. 1-225, 1986.

JANES, K., NEUMANN, W. L., & SALVEMINI, D. Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 815–821, 2012.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. M. (Eds.) *Acute Pain: Mechanisms & Management*. **St. Louis: Mosby-Year Book**, v. 2, p. 8-28, 1992.

JORDÃO, C. O., ALBUQUERQUE, S., LOPES, N. P., LOPES, J. L. C. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora gardneri* Schultz-Bip. In: 23 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, **Livro de Resumos**, v.2, p. 59, 2000.

JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

JUNIOR, G.H. Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 (*toll-like receptor 2*): modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF). **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Medicina Tropical, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

KIM, S.J., JEONG, H.J., MOON, P.D., LEE, K.M., LEE, H.B., JUNG, H.J., JUNG, S.K., RHEE, H.K., YANG, D.C., HONG, S.H., KIM, H.M. Anti-inflammatory activity of gumi-ganghwaltang through the inhibition of nuclear factor-k B activation in peritoneal macrophages. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 233–237, 2005.

KLAUMANN, P.R., WOUK, A.F.P.F., SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KONG, L.D., ZHANG, Y., PAN, X., TAN, R.X., CHENG, C.H.K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 3, p. 500-505, 2000.

LEE, K.H., HALL, I.H., MAR, E.C., STARNES, C.O., ETGEBALY, S., WADDELL, T.G., HADGRAF, R.I., RUFFNER, C.G., WEIDNER, I. Sesquiterpene Antitumor Agents: Inhibitors of Cellular Metabolism. **Science**, v. 196, p. 533-536, 1977.

LIMA, R.R., COSTA, A.M.R., SOUZA, R.D., GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LIMA, R.L. Avaliação das atividades anti-hiperuricêmica, antiartrite gotosa e antioxidante de extratos brutos das folhas de *Sparattosperma leucanthum* e estudo fitoquímico do extrato acetato etílico. **Dissertação** (Mestrado). Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 43 f., 2014.

LIOTÉ, M.D., EA, H.K. Gout: update on some pathogenic and clinical aspects. **Rheumatic Diseases Clinic of North America**, v. 32, p. 295–311, 2006.

LEMOES LIMA, R.D.C., FERRARI, F.C., DE SOUZA, M.R., DE SÁ PEREIRA, B.M., DE PAULA, C.A., & SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Effects of extracts of leaves from *Sparattosperma leucanthum* on hyperuricemia and gouty arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p.194–199, 2015.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MACHADO, L.P., KOHAYAGAWA, A., SAITO, M.E., SILVEIRA, V.F., YONEZAWA, L.A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, 2009.

MAIOLI, N.A., ZARPELON, A.C., MIZOKAMI, S.S., CALIXTO-CAMPOS, C., GUAZELLI, C.F.S., HOHMANN, M.S.N. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 0, p. 0, 2015.

MARIATHASAN, S., NEWTON, K., MONACK, D.M., VUCIC, D., FRENCH, D.M., LEE, W.P., ROOSE-GIRMA, M., ERICKSON, S., DIXIT, V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, p. 213–218, 2004.

MARTINON, F., BURNS, K. & TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular Cell**, v. 10, p. 417–426, 2002.

MARTINON, F., PETRILLI, V., MAYOR, A., TARDIVEL, A., TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, p. 237- 241, 2006.

MARTINS DE SÁ MÜLLER, C., COELHO, G. B., CAROLINA DE PAULA MICHEL ARAÚJO, M., & SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. *Lychnophora pinaster* ethanolic extract and its chemical constituents ameliorate hyperuricemia and related inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, 2019.

MCINNES, G. T., LAWSON, D. H., JICK, H. Acute adverse reactions attributed to allopurinol in hospitalised patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 245-249, 1981.

MEDIAVILLA, J.M, e MIGUEL, C. Abordagem actual da Gota. **Acta Medica Portuguesa**. Instituto Português de Reumatologia, Lisboa, Portugal, v. 24, n. 5, p. 791-798, 2011.

MEDZHITOV, R., JANEWAY JR., C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 4–9, 1997.

MEYER, R.A., CAMPBELL, J.N., RAJA, S.N. Peripheral neural mechanisms of nociception In: P.D. Wall, R. Melzack (Eds.), **Textbook of Pain**. Churchill-Livingstone, Edinburgh, p. 13-44, 1994.

MOGIL, J.S., YU, L., BASBAUM, A.I. Pain genes: natural variation and transgenic mutants. **Annual Review Neuroscience**, v. 23, p. 777-811, 2000.

MÖLLER, K.Ä.; JOHANSSON, B. O.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of neuroscience methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, 1998.

MORIKAWA, K., NONAKA, M., NARAHARA, M., TORII, I., KAWAGUCHI, K., YOSHIKAWA, T., KUMAZAWA, Y., MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, v. 74, p. 709–721, 2003.

MULLER, C.S.M. Efeitos do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* e de seus constituintes químicos na hiperuricemia e gota. **Dissertação (Mestrado)**. Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 2, p. 145-53, 1987.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, Porto Alegre: Artmed Editora, v. 2, 2014.

NETO, O.A. Dor: Princípios e prática. **Artmed Editor**, 1 Ed, p. 1 – 631, 2009.

OLIVEIRA, A.B., SAÚDE D.A., PERRY, K.S.P., DUARTE, D.S., RASLAN, D.S., BOAVENTURA, M.A.D., CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 4, p. 292-295, 1996.

OLIVEIRA, V.J.S. Caracterização das Produções Científicas Sobre Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais: Revisão Integrativa. **Characterization Of Scientific Productions On Ethnobotanical Survey Of Medicinal Plants: Integrative Review**, v. 21, n. 6, p. 42-47, 2017.

OMS, General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. **Organização Mundial da Saúde**. Genebra, 2000.

ORELLANO, L.A.A. Avaliação do efeito do inibidor da enzima xantina oxidase (Alopurinol) no modelo murino de angiogênese inflamatória. **Dissertação (Mestrado)** – Curso de Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 66f., 2015.

PARK, J.Y., PILLINGER, M.H., & ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v. 119, p. 229-240, 2006.

PARK, H.H., LEE, S., SON, H.Y., PARK, S.B., KIM, M.S., CHOI, E.J., SINGH, T.S., HA, J.H., LEE, M.G., KIM, J.E., HYUN, M.C., KWON, T.K., KIM, Y.H., KIM, S.H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro-inflammatory cytokines in mast cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 1303–1311, 2008.

PARK, J.W., KO, D.J., YOO, J.J., CHANG, S.H., CHO, H.J., KANG, E.H. Clinical factors and treatment outcomes associated with failure in the detection of urate crystal in patients with acute gouty arthritis. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 29, p. 361–369, 2014.

PASALIC, D., MARINKOVIC, N., FEHER-TURKOVIC, L. Review Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders – Facts and controversies. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 22, p. 63–75, 2012.

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 2-7, 2013.

PIOTROWSKI, W., FOREMAN., J.C - Some effects of calcitonin generated peptide in human skin and on histamine release. **British Journal of Dermatology**, v. 114, p.37-46, 1986.

RAMONDA, R., OLIVIERO, F., GALOZZI, P., FRALLONARDO, P., LORENZIN, M., ORTOLAN, A., SCANU, A., PUNZI, L. Molecular mechanisms of pain in crystal-induced arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 1, p. 98-110, 2015.

REUTER, S., GUPTA, S.C., CHATURVEDI, M.M., AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

REN K, DUBNER R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, v. 16, p. 1267-76, 2010.

ROCHA, A.P.C., KRAYCHETE, D.C., LEMONICA, L., CARVALHO, L.R.DE; BARROS, G. A.M.DE; GARCIA, J.B.S.; & SAKATA, R.K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94–105, 2007.

ROBLES. M., AREGULLIN, M., WEST, J., RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacology, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p.199-203, 1995.

ROBERTS, W.N. Colchicine in acute gout. **Jama**, v. 275, n. 14, 1920.

RODDY, E., CHOI, H.K. Epidemiology of gout. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 40, p. 155–175, 2014.

RODRIGUEZ, E., TOWERS, G.H.N., MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1573-1580, 1976.

ROTHERWELL, N.J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 430-436, 1991.

ROSA, S.I.G., RIOS-SANTOS, F., BALOGUN, S.O., DE OLIVEIRA, D.T.M. Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. **Phytomedicine**, v. 23, n. 1, p. 9-17, 2016.

SABINA, E.P., NAGAR, S., RASOOL, M.A. role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation-an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, v. 34, n. 3, p. 184–192, 2011.

SANTOS, D.F. Gota: Uma revisão. **Revista Médica da UFPR**, v. 3, n. 1, p. 25-31, 2016.

SANTOS, M.D., GOBBO-NETO, L., ALBARELLA, L., SOUZA, G.E.P., LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 545-549, 2005.

SAÚDE, D.A., RASLAN, D.S., SOUZA FILHO, J.D., OLIVEIRA, A.B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpa*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 90–91, 1998.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A., BARRERO, A.F., OLTRA J.E., JUSTÍCIA, J., RASLAN, D.S., SILVA, E.A. Atividade Antibacteriana de Furanoelíngolidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 7-11, 2002.

SARGENT, M.G. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 476, 1987.

SATO, Y., ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., OGURA, J., KOBAYASHI, M., HIRANO, T., ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 136–138, 2011.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SEMIR, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart (Vernoniaceae: Compositae). **Tese** (Doutorado) - Curso em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 515 f. ,1991.

SHERRINGTON, C.S. The integrative action of the nervous system. **New York: Charles Scribner and Sons**, v.1, p. 1857-1952, 1906.

SILVA, Paulo Sérgio Siberti da. Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* Mart. **Tese** (Doutorado) - Curso de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 196 f., 2016.

SILVEIRA, D., SOUZA FILHO, D.J., OLIVEIRA, A.B., RASLAN, D.S. Lychnophoric acid from *Lychnophora pinaster*: a complete and unequivocal assignment by NMR spectroscopy. **Eclética Química Journal**, v. 30, p. 37-41, 2005.

SILVEIRA, D., WAGNER, H., CHIARI, E., LOMBARDI, J. A., ASSUNÇÃO, A. C., OLIVEIRA, A. B., RASLAN, D. S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2005a.

SILVEIRA, N.R. Agonistas α -adrenérgicos modulam canais iônicos nociceptivos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal. **Dissertação** (Mestrado) – Curso de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 62 f., 2014.

SMITH, J.A., AMAGASU, S.M., EGLIN, R.M., HUNTER, J.C., & BLEY, K.R. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. **British Journal Pharmacology**, v. 124, n.3, p. 513–523, 1998.

SOUZA, G.H.B. de; LOPES, N.P. (Orgs.). As arnicas endêmicas das serras do Brasil - uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae). Ouro Preto: **Editora UFOP**, p. 212, 2011.

SOUZA, M.R., DE PAULA, C.A., PEREIRA DE RESENDE, M.L., GRABE-GUIMARÃES, A., DE SOUZA FILHO, J.D., & SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 845–850, 2012.

SOUSA, A. D. Efeito do método de extração e da secagem sobre o conteúdo fenólico e a composição química de quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus niruri*). **Dissertação** (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 119 f., 2017.

STRILCHUK, L., FOGACCI, F., & CICERO, A. F. Safety and tolerability of available urate-lowering drugs: a critical review. **Expert Opinion on Drug Safety**, p.1–11, 2019.

TAUSCHE, A.K., JANSEN, T.L., SCHRODER, H.E., BORNSTEIN, S.R., ARINGER, M., MULLER-LADNER, U. Gout – Current Diagnosis and treatment. **Dtsch Arztebl International**, v. 106, n. 34-35, p.549–555, 2009.

TERKELAUB, R.A. Pathogenesis and treatment of crystalinduced inflammation. **In Arthritis and allied conditions**, 14th ed, ed. W.J. Koopman, Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, p. 2329–2347, 2001.

TRACEY K.J., CERAMI F.A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 10, p. 423-435, 1993.

TRACEY, D., KLARESKOG, L., SASSO, E.H., SALFELD, J.G., TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008.

VANE, J.R., BOLTING, R.N. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. **Inflammation Research**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 1995.

VARELLA, P. P. V., & FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146–154, 2001.

VERRI, J.W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116–138, 2006.

VICHNEWSKY, W., SARTI, S.J., GILBERT, B., HERZ, W. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. **Phytochemistry**, v.15, p.191-193, 1976.

VIEGAS, C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, 2006.

WALSH, L.J. Mast cells and oral inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 14, n 3, p. 188–198, 2003.

WANG, Z. Q., PORRECA, F., CUZZOCREA, S., GALEN, K., LIGHTFOOT, R., MASINI, E., MUSCOLI, C., MOLLACE, V., NDENGELE, M., ISCHIROPOULOS, H., SALVEMINI, D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 3, p. 869-78, 2004.

WELLS, B. G., DIPIRO, T. J., SCHWIGHAMMER, T. L., DIPIRO, V. C. **Manual de farmacoterapia**. 9. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000.

Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, p.78–84, 1992.

ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., & LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZHANG, W., DOHERTY, M., PASCUAL, E., BARDIN, T., BARSKOVA, V., CONAGHAN, P. EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT). **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 65, p. 1301–1311, 2006.

ZHANG, Y., WANG, D., YANG, L., ZHOU, D., & ZHANG, J. Purification and Characterization of Flavonoids from the Leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and Correlation between Their Structure and Antioxidant Activity. **Plos One**, v. 9, n. 8, 2014.

ZARPELON, A.C., PINTO, L.G., CUNHA, T.M., VIEIRA, S.M., CARREGARO, V., SOUZA G.R., SILVA, J.S., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., VERRI JUNIOR, W.A. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF α and CXCL1/CXCR2 in mice. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 187–199, 2012.

ZARPELON, A.C.; CUNHA, T.M.; ALVES-FILHO, J.C.; PINTO, L.G.; FERREIRA, S.H.; MCINNES, I.B.; XU, D.; LIEW, F.Y.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A.JR. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **British Journal Pharmacology**, v. 169, n.1, p. 90-101, 2013.

13. ANEXOS

13.1 Protocolo CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA N°. 189/2016, de 16 de Dezembro de 2016

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Dênia Antunes Saúde Guimarães
CiPharma

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n°. 2016/46, intitulado “*Avaliação das atividades anti-hiperuricêmica e antiartrite gotosa de Lychnophora pinaster em camundongos Swiss e C57BL/6.*”.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n° 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.