

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANALGÉSICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Chenopodium ambrosioides* L. EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS.¹

SOUSA, Luís Henrique Albuquerque²
RIOS, Carlos Eduardo Pereira²
ASSUNÇÃO, Anne Karine Martins²
FIALHO, Eder Magalhães Silva³
COSTA, Graciomar Conceição³
NASCIMENTO, Flavia Raquel F⁴

Resumo: A dor é definida como uma sensação ou experiência emocional desagradável, associada ao dano tecidual atual ou potencial, ou descrita em tais termos. Estima-se que a dor crônica esteja presente em quase metade da população geral, sendo responsável por cerca de 1/5 de incapacidades moderadas e graves, assim como prejuízos familiares e sociais. O desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas é fundamental e neste contexto são necessárias pesquisas em produtos naturais, responsáveis por cerca de 30% de novas drogas analgésicas. A espécie *Chenopodium ambrosioides* L. (Mastruz) possui diversas atividades comprovadas como imunomoduladora, antifúngica, leishmanicida, antitumoral, anti-inflamatória e analgésica, porém ainda sem detalhes de vias envolvidas e seu papel imunológico no controle da dor. O objetivo desse estudo foi verificar se o efeito analgésico é válido para dose menor que a relatada anteriormente, além de investigar mecanismos imunofarmacológicos associados. Camundongos Swiss fêmeas (11 semanas) foram divididos nos seguintes grupos: Controle Negativo: tratamento com água destilada; Controle Positivo: tratamento com indometacina na dose de 10mg/kg e EHCA: tratamento com extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* na dose de 50mg/kg. Todos os animais foram tratados por gavagem 1 hora antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 1% (10ml/kg). O número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi quantificado. Os animais foram sacrificados após 24 horas e os seguintes parâmetros foram avaliados: número total e diferencial de células da cavidade peritoneal e a produção de H₂O₂ espontânea ou estimulada por 13-acetato 12-miristato de forbol (PMA). O EHCA é capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, tal como o anti-inflamatório não esteroide indometacina, sugerindo analgesia em modelo não específico de dor. Ambos os produtos foram capazes de alterar o perfil celular da cavidade peritoneal, mas não de aumentar a produção de H₂O₂, espontânea ou estimulada por PMA. Mais estudos são necessários para elucidar a relação sistema imunológico e analgesia ao uso do EHCA.

Descritores: *Chenopodium ambrosioides*; Medição da Dor; Analgesia; Sistema Imunológico.

Abstract: Evaluation of analgesic action of *Chenopodium ambrosioides* L. hydroalcoholic extract in pre-clinical assays. Pain is defined as an unpleasant feeling or emotional experience, associated with actual or potential tissue damage or described in such terms. It is estimated that chronic pain is present in almost half the general population, accounting for about 1 / 5 to moderate and severe disabilities, as well as family and social impairment. The development new therapeutic options is essential; in this regard, research is necessary in the area of natural products, which account for about 30% of new analgesic drugs. The species *Chenopodium ambrosioides* L. (Mastruz) owns previously attested several activities like immunomodulatory, antifungal, leishmanicidal, antitumoral, anti-inflammatory and analgesic, although remains no details from involved pathways and its role in immune pain control. The aim of this was to check if the analgesic effect applies to a lower dose than previously reported one and also investigate pharmacological-immune mechanisms associated with. Female Swiss mice (11 weeks) were sorted into the following groups: Negative control: distilled water treatment. Positive Control: 10mg/kg Indomethacin dose treatment. CAHE: 50mg/kg *C. ambrosioides* hydroalcoholic extract dose treatment. All animal were treated by gavage 1 hour before the intraperitoneal injection of 1% acetic acid (10ml/kg). The number of acetic acid- induced writhings was quantified. The animals were sacrificed 24 hours later and the following parameters were evaluated: total and differential cell number from the peritoneal cavity and the spontaneously or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated H₂O₂ production. The CAHE is able to reduce the number of acid acetic-induced abdominal writhings, as well as nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin, suggesting analgesia in a non-specific pain model. Both products have been able to change the cell profile of the peritoneal cavity, but not to increase the spontaneously or PMA-stimulated H₂O₂ production. More studies are required to elucidate the relation between immune system and analgesia on CAHE use.

Descriptors: *Chenopodium ambrosioides*; Pain Measurement; Analgesia; Immune System.

¹ Artigo apresentado ao Curso de Medicina da UFMA como Trabalho de Conclusão de Curso.

² Graduandos em Medicina, UFMA. ³Mestre em Ciências da Saúde, UFMA. ⁴Doutorandos em Patologia experimental, Fiocruz-BA. ⁵Professora Adjunta do Departamento de Patologia, UFMA.

INTRODUÇÃO

A dor é definida como “uma sensação ou experiência emocional desagradável”, associada ao dano tecidual atual ou potencial, ou descrita em tais termos. É sempre subjetiva, não necessita ser verbal e relaciona-se com as experiências vividas²⁴.

Estima-se que a dor crônica esteja presente em quase metade da população geral^{13,20}, ou seja, um número duas vezes maior que a dor aguda em pessoas empregadas, sendo responsável por cerca de 1/5 de incapacidades moderadas e graves⁴⁰. A dor crônica tem alto impacto individual, afetando o bem estar, bem como familiar e social, alterando relações familiares e induzindo aposentadorias precoces por incapacidade de trabalho para executar funções dantes corriqueiras⁴¹.

Dois estudos europeus atuais demonstraram o impacto da dor crônica e seu tratamento, apesar de grandes variações entre os resultados dos países arrolados. São em média 7,8 dias perdidos de trabalho nos últimos 6 meses, havendo ainda alteração laboral (perda ou mudança de emprego ou mudança de funções no mesmo ofício) em quase metade dos entrevistados⁶. Número maior de pacientes não possui manejo adequado da dor crônica³¹ e não está satisfeita com o tratamento prescrito⁶. Cerca de 30-70% dos pacientes utilizou tratamentos não médicos^{6,31}.

A busca de comprovação científica para os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos de terapias alternativas, em especial do uso de produtos naturais, tem sido alvo de pesquisas em todo o mundo^{2,19,26,42}. Muitas delas encontram-se ainda em fase pré-clínica com modelos animais^{11,12,17,21}, condição *sine qua non* para desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas.

O uso de modelos animais para os testes anti-inflamatórios é inquestionável, uma vez que os efeitos observados são claramente mensuráveis, entretanto, a ausência de comunicação verbal em animais é sem dúvida um obstáculo para avaliação da dor. Além disso, reações animais tais como grunhidos, gemidos ou mesmo não se movimentar livremente podem erroneamente ser interpretadas como sensações dolorosas, uma vez que temos a tendência de humanizar as suas reações. De forma

similar, o animal que não apresentar sinais físicos típicos de sensação dolorosa ou mudanças de comportamento em um determinado momento, não implica em ausência de dor⁴.

Devido às diversas etiologias de condições álgicas em seres humanos, não há modelo experimental de dor crônica capaz de englobar com alta efetividade, similaridades clínicas e patológicas, além de validade preditiva para teste de drogas¹⁶.

A despeito das dificuldades inerentes aos modelos animais e do surgimento de novas técnicas de imagem, além do maior número de ensaios clínicos, a utilização de seres humanos não deve suplantar o uso de animais em pesquisas de fisiopatologia da dor e *screening* de medicações analgésicas²⁷.

Em recente revisão acerca do surgimento de novas entidades químicas (excluindo-se combinações) foi informado que cerca de 30% do total de drogas analgésicas são de origem natural e sintética-mimetizando ou baseando-se em produtos naturais³⁰. Dessa forma, a diversidade química proveniente de produtos naturais ainda é importante para desenvolvimento de novas drogas, apesar da mudança de foco da indústria farmacêutica, decorrente de objetivos mais rentáveis, mas não necessariamente mais científicos e seguros, para produtos baseados em alvos moleculares e bases químicas de propriedades bem definidas²³.

Nesse contexto de investigação de produtos naturais para desenvolvimento de novos potenciais terapêuticos, encontramos a espécie *Chenopodium ambrosioides* L., que é conhecida popularmente como mastruz ou erva-de-Santa-Maria. É uma planta nativa sul-americana, que apresenta características organolépticas fortes, cujo óleo é rico principalmente em terpenos²². Popularmente um suco da planta toda é extraído com leite, e tomado antes do desjejum, sendo indicado como vermífugo, expectorante e digestivo¹. Diversas atividades biológicas desta espécie já foram comprovadas, como antifúngica²², leishmanicida³³, imunomodulatória¹⁰, antitumoral²⁹, inclusive por interações no DNA, o que pode ser o principal responsável pelo seu efeito citotóxico¹⁴. Possui ainda atividade anti-inflamatória e analgésica²¹, mas ainda sem detalhes sobre vias envolvidas e sem análise de padrão imunológico da dor.

Este estudo visou avaliar se o efeito analgésico é válido para dose menor que as relatadas em ratos²¹, e contribuir na investigação de mecanismos imuno-analgésicos associados a essa resposta.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L. foi cultivada no Horto Medicinal Berta Langes de Morretes, situado no Campus da Universidade Federal do Maranhão (Bacanga/ São Luís-MA-Brasil). As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Ático Seabra da UFMA sob o N° 0998. As folhas da espécie vegetal foram coletadas de acordo com as normas estabelecidas na literatura e em quantidade adequada para a realização das análises biológicas e químicas¹⁸.

Preparação do extrato orgânico

As folhas das espécies vegetais foram secas, em estufa com circulação de ar, pulverizadas e extraídas através do processo de maceração com álcool etílico PA (Merck, Brasil) a 70% em água. O processo de extração foi repetido por 2 vezes, sendo que a cada extração foi adicionado ao macerado a mesma quantidade de álcool etílico. Ao fim do processo de maceração as soluções extrativas foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato hidroalcolóico de *Chenopodium ambrosioides* (EHCA). A dose utilizada nos animais foi de 50 mg/kg.

Preparo de soluções

Para preparo da indometacina, o conteúdo de cápsulas de Indometacina (Merck-Sharp e Dhome) foram solubilizadas em água destilada. A dose utilizada nos animais foi de 10mg/kg¹⁷. Para preparo da solução de Ácido Acético 1%, o ácido acético (Sigma) foi preparado a partir da diluição do ácido em água apiogênica.

Animais e tratamento

Foram utilizados camundongos, fêmeas, da linhagem Swiss com idade de 11 semanas, pesando entre 25 e 30g, fornecidos pelo Biotério Central

da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram aclimatados para as condições do biotério de experimentação do Laboratório de Imunofisiologia por dez dias antes do início do experimento, submetidos condições controladas de umidade (45-65%), e luz artificial em ciclos de 12 horas claro/escuro (7:00am/7:00 pm). Foram mantidos em gaiolas com 10-12 animais e tiveram consumo de ração e água *ad libitum*³². Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo comitê local de ética animal (Protocolo CEP/UFMA n°23115-012975/2008-43) e estão de acordo com as normas do da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Modelo de dor aguda – teste de contorção abdominal

Foram utilizados 15 animais, distribuídos em 3 grupos, seguindo o delineamento experimental descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos e protocolo experimental.

Grupo	Tratamento Profilático	Estímulo	Observação e Avaliação da Dor
Controle Negativo (CN)	Água Destilada (0,2mL)	Ac. Acético 1% 0,3mL ip.	Por 30 minutos
Controle Positivo (CP)	Indometacina 10mg/kg (0,2mL)	Ac. Acético 1% 0,3mL ip.	Por 30 minutos
EHCA	EHCA 50mg/kg (0,2mL)	Ac. Acético 1% 0,3mL ip.	Por 30 minutos

Os animais foram tratados conforme descrito na Tabela 1, por gavagem, 1 hora antes da aplicação de substância algogênica (ácido acético 1%, 10mL/kg, por via intraperitoneal-ip.)^{11,17}. A partir de então, os animais foram colocados individualmente em funis e foram contabilizadas as contorções abdominais durante os 30 minutos seguintes com auxílio de um contador manual³⁵.

Avaliação da inflamação no modelo de dor utilizada Obtenção e contagem total de células peritoneais

Para avaliar se o efeito analgésico do EHCA e da indometacina estaria ou não associado a um efeito anti-inflamatório, os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção de ácido acético para quantificação das células presentes no exsudato inflamatório. Para a quantificação das células, a cavidade peritoneal foi lavada com

5mL de solução tamponada com fosfato (PBS) estéril. As suspensões celulares foram colhidas com auxílio de seringa de 5mL, mantidas em tubos de polipropileno com fundo cônico (Costar) e deixadas em banho de gelo ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). O ajuste do número de células na concentração desejada foi determinado pelo percentual de células vivas pelo método de exclusão de Trypan. Para a contagem das células foram retiradas 90 μL das suspensões celulares obtidas, e estas foram fixadas e coradas em 10 μL de uma solução contendo 0,05% de cristal violeta diluído em ácido acético 30% em tubo de hemólise. As células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio ótico de luz comum.

Contagem diferencial das células do peritônio

Para a realização da contagem diferencial das células peritoneais, foi feito um ajuste de células para 4×10^6 células/mL. Desse rendimento, uma alíquota de 200 μL foi colocada em citospin para a preparação de lâminas com células peritoneais que foram posteriormente coradas (Kit Instante-Prov, Newprov) e contadas em microscópio de luz comum diferenciando-as em neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, obtendo-se assim a porcentagem destes tipos celulares no peritônio dos animais.

Determinação da liberação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A determinação da liberação de H_2O_2 foi realizada pelo método de oxidação da peroxidase dependente do vermelho de fenol²⁸. As células peritoneais foram quantificadas e ressuspensas em solução de vermelho de fenol. Para o preparo desta solução foram feitas 3 soluções diferentes, da seguinte forma: Solução A: 40g de NaCl, 1g de KCl, 5,75g de Na_2HPO_4 , 1g de KH_2PO_4 em 400mL de água deionizada. Solução B: solução de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,3% (p/v) em água deionizada. Solução C: solução de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 2,1% (p/v) em água deionizada. A solução final foi constituída de 0,8mL da solução A, 0,1mL da solução B, 0,1mL da solução C, 1mL de solução de glicose à 1% (p/v) em água deionizada, 0,1mL de meio ver-

melho de fenol à 10% (p/v) em água deionizada, 0,1mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma) numa concentração de 0,5mg/mL de PBS e 7,8mL de água destilada.

Alíquotas de 100 μL da suspensão celular 2×10^6 células/ml de solução de vermelho de fenol foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços de cultura. Os ensaios foram feitos em quadruplicata. Em 2 destes poços foram acrescentados 10 μL de Acetato Miristato de Forbol (PMA) diluído em dimetil sulfoxido (DMSO), de maneira a se obter uma concentração final de 10ng por poço. A placa foi incubada à 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 e atmosfera úmida por 1 hora. Após esse período, a placa foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outra placa. A reação foi interrompida pela adição de 10 μL de NaOH 1N por poço. A absorbância foi mensurada a 620 nm em leitor de microplacas (MR 5000, Dynatech Laboratories Inc., Gainesville, VA, USA). Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O.) foram transformados em μM de H_2O_2 , mediante equação linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5, 10, 20 e 40 μM de H_2O_2).

Análise Estatística

Para comparar os grupos foi utilizada a Análise de variância (ANOVA), seguida do teste Newman - Keuls, sendo o nível de significância, considerado quando $p \leq 5\%$, utilizando o software GraphPadPrism versão 5.0. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (Standard Error of Mean - S.E.M.) de 5 animais/grupo.

RESULTADOS

Avaliação antinociceptiva

O EHCA utilizado por via oral de forma profilática, na dose de 50 mg/kg, reduziu de forma significativa o número de contorções abdominais quando comparado ao controle negativo. Apesar de não haverem diferenças

estatísticas em relação à indometacina quanto ao potencial inibitório (Figura 1), é observado que o EHCA foi menos eficiente que a indometacina (Tabela 2).

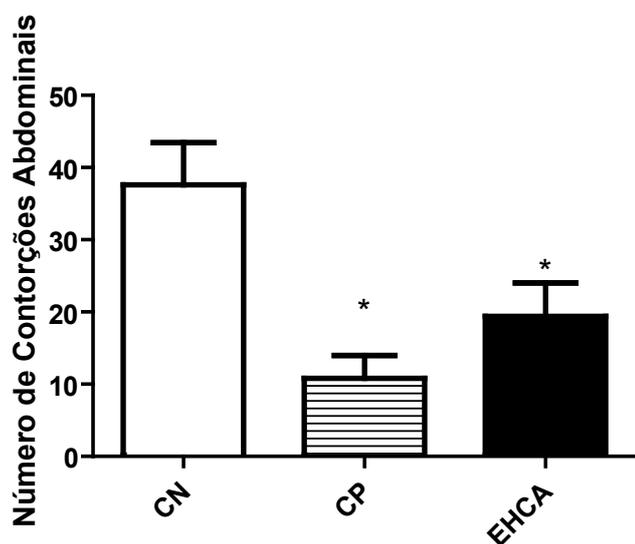


Figura 1 - Efeito do tratamento profilático com extrato hidroalcolóico de *Chenopodium ambrosioides* sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Camundongos Swiss receberam, por gavagem, água destilada (CN: controle negativo), indometacina (10mg/Kg) (CP: controle positivo) ou EHCA (50mg/Kg) e após 1 hora receberam, por via ip., estímulo algogênico com ácido acético 1%. Os animais foram então mantidos isolados e foram contadas as contorções abdominais durante 30 minutos. Os dados representam a média ± SEM de 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao controle negativo.

Tabela 2 - Inibição de Contorções Abdominais.

	Controle Positivo	EHCA
Número de Contorções Abdominais (%)	10,8	19,4
inibição em relação ao controle negativo	(70,3%)	(48,1%)

Avaliação da contagem total e diferencial de células na cavidade peritoneal

O controle positivo e EHCA induziram aumento significativo do número de células na cavidade peritoneal, sendo este número maior no controle positivo. O infiltrado celular foi constituído basicamente por neutrófilos e macrófagos nos três grupos, sendo que o tratamento com in-

dometacina aumentou o número de neutrófilos em relação ao controle negativo e aumentou o número de macrófagos em relação a este mesmo controle e ao grupo EHCA. O grupo tratado com EHCA por sua vez apresentou aumento do número de neutrófilos quando comparado ao controle, mas não apresentou diferenças em relação ao número de macrófagos (Figura 2). Não houve alterações significativas do número de linfócitos e mastócitos em relação ao controle negativo (dados não mostrados).

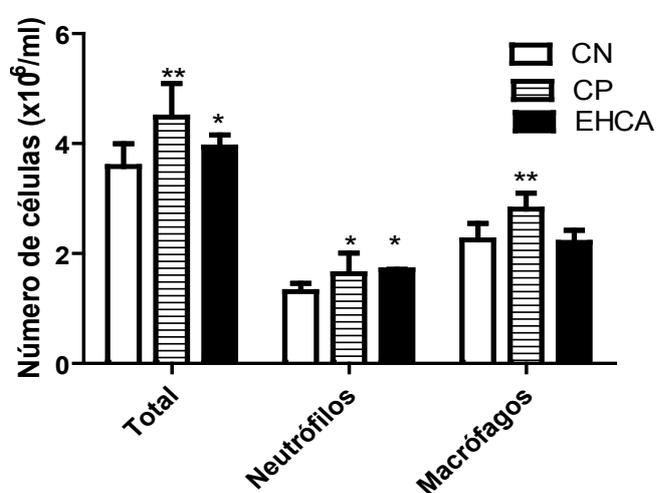


Figura 2 - Contagem Total e Diferencial de Células da Cavidade Peritoneal. Camundongos Swiss receberam, por gavagem, água destilada (CN: controle negativo), indometacina (10mg/Kg) (CP: controle positivo) ou EHCA (50mg/Kg) e após 1 hora receberam, por via ip., estímulo algogênico com ácido acético 1%. Os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção de ácido acético e foi feita a contagem total e diferencial das células peritoneais. Os dados representam a média + SEM de 5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao controle negativo. **p<0,05 em relação ao controle negativo e EHCA.

Avaliação da produção de H₂O₂ espontânea e induzida por solução de PMA

Apesar de ter induzido o aumento do recrutamento de células ao peritônio, o tratamento profilático com EHCA e indometacina não alterou a secreção de H₂O₂ *ex vivo* espontânea (Figura 3A) ou estimulada por PMA (Figura 3B), pelas células peritoneais.

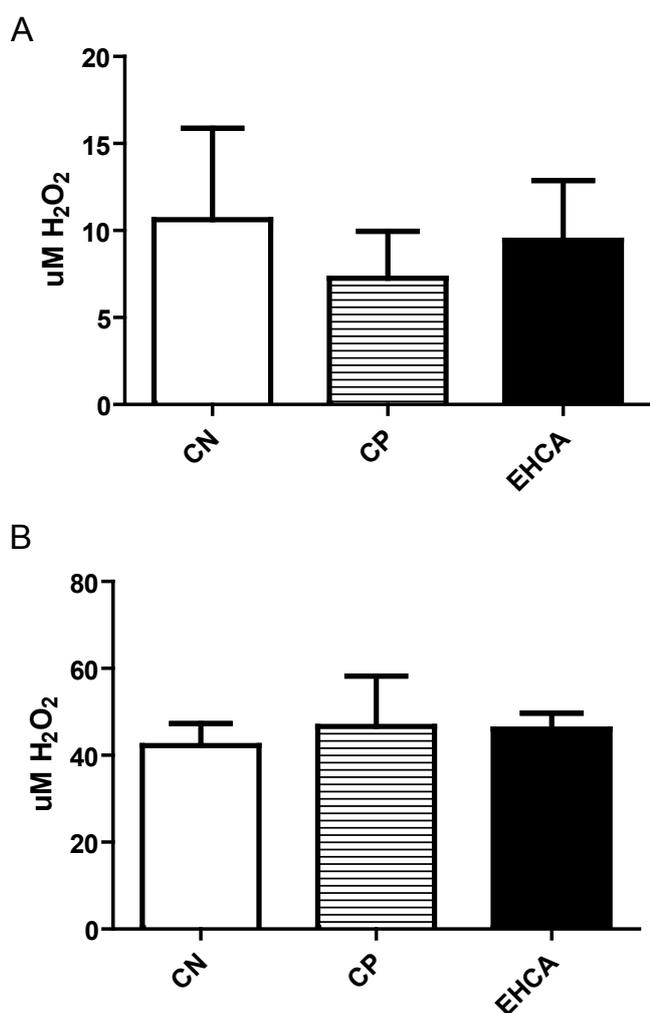


Figura 3 - Efeito do tratamento profilático com extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Camundongos Swiss receberam, por gavagem, água destilada (CN: controle negativo), indometacina (10mg/Kg) (CP: controle positivo) ou EHCA (50mg/Kg) e após 1 hora receberam, por via ip., estímulo algogênico com ácido acético 1%. Os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção de ácido acético. As células peritoneais foram cultivadas para avaliação da secreção de peróxido de hidrogênio espontânea (A) ou estimulada por PMA (B). Os dados representam a média + SEM de 5 animais por grupo.

DISCUSSÃO

O modelo de contorções abdominais é um modelo de dor inflamatória aguda relacionado principalmente a via da cicloxigenase¹³ e, portanto, de nociceção²⁴, constituindo teste sensível para analgésicos de ação periférica^{12,35} e que possui baixa especificidade⁴. Nossos resultados demons-

traram que o tratamento profilático com EHCA e com indometacina reduzem de forma significativa o número de contorções abdominais, corroborando com resultado de estudos prévios^{17,21}. O EHCA, apesar de induzir alterações renais pontuais, não apresenta toxicidade subcrônica na dose terapêutica (5mg/kg) e não causa morte dos animais mesmo em dose 10 vezes maior³⁴, que corresponde à dose utilizada em nosso estudo (50mg/kg). Entretanto, apesar de esta dose ser maior que a terapêutica, é 4 a 8 vezes menor que a previamente utilizada, ao nosso conhecimento, no único relato de efeito analgésico da espécie *Chenopodium ambrosioides* L. e em ratos²¹. Estudo esse que não elucidar detalhes sobre vias envolvidas e não avalia a relação da dor com o contexto inflamatório associado.

Atualmente é muito discutido o papel da dor na resposta imune e suas modulações recíprocas. As células imunes possuem efeito modulador importante não somente nos tecidos inflamados, com também em lesões nervosas e no sistema nervoso central²⁵. Sabe-se que leucócitos são fontes de mediadores hiperalgésicos e analgésicos³⁶. Destes, destacam-se os peptídeos opióides endógenos, que além de analgesia, não são limitados pelo fenômeno de tolerância que ocorre com medicamentos opióides³⁹, podendo inclusive diminuir este efeito ao uso dessas drogas⁴³. Na inflamação, esses peptídeos são fornecidos durante a fase aguda principalmente por granulócitos e em fase tardia por monócitos e macrófagos³⁷. Os granulócitos armazenam em seus grânulos primários, liberando-os concomitantemente com enzimas bactericidas³⁸.

A indometacina, controle positivo escolhido para o estudo por ser o primeiro anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) não-aspirina a ser introduzida no mercado⁷, inibe a síntese de prostaglandinas³⁹, como a E₂ (PGE₂). É conhecido que a PGE₂ inibe o feedback da resposta imune celular¹⁶, podendo ser esse o motivo do relatado efeito imunomodulatório dos AINEs nas funções de macrófagos e linfócitos T⁹.

Para investigar se o efeito analgésico do EHCA estaria ou não relacionado a um efeito anti-inflamatório ou imunomodulador concomitante e isto estar causando a analgesia, investigamos o

perfil de células inflamatórias presentes no peritônio, 24 horas após a injeção do ácido acético, bem como a ativação destas pela produção de peróxido de hidrogênio. Em nosso estudo, dados relevantes para a sugestão de um possível mecanismo de ação são as semelhanças de efeitos do EHCA e da indometacina, ou seja, analgesia inicial e presença de recrutamento celular na inflamação tardia. Outro fato similar é que ambos foram incapazes de promover a secreção de H_2O_2 tanto espontaneamente (derivada de macrófagos) quanto estimulada por PMA (derivada de macrófagos e neutrófilos). Esses resultados podem sugerir imunomodulação, ou que o efeito analgésico de ambos é efêmero, ou que a inibição de mediadores pré-formados poderia vir a desencadear um efeito rebote posterior. Para testar estas hipóteses será imprescindível a realização de uma avaliação da inflamação peritoneal aguda, ou seja, imediatamente após a quantificação das contorções abdominais para verificar se os mediadores inflamatórios estariam inibidos durante o efeito analgésico e ainda, avaliar a produção de citocinas locais e séricas para investigar a imunomodulação.

Nossos resultados divergem quanto ao tipo de recrutamento celular induzido pelo *C. ambrosioides* demonstrado anteriormente pelo nosso grupo¹⁰, pois naquele estudo decorreu-se basicamente por macrófagos e linfócitos, tal como implicado no uso de AINEs⁹, enquanto neste, exclusivamente por neutrófilos. Uma possível explicação encontra-se no uso de diferentes vias de administração do EHCA entre os experimentos.

Entretanto, a explanação mais provável para a mudança do predomínio de macrófagos e linfócitos para neutrófilos ocorrido no tratamento com EHCA seja a resposta de imunomodulação frente ao estímulo inflamatório e nociceptivo do ácido acético. Esse efeito protegeria os animais de uma resposta inflamatória exagerada, que pode ocorrer pela não-resolução do estímulo durante a mudança da fase da inflamação para o reparo. Nosso estudo avalia inflamação em uma fase tardia, uma vez que não é mais caracterizada a fase aguda – pelo tempo do estímulo doloroso ao sacrifício e por não haver predomínio de neutrófilos no sítio de estímulo¹², e sim macrófagos. Esta imunomodulação também

existente ao uso de indometacina, embora teoricamente de forma menos eficiente, pois seu uso no modelo estudado apresentou tanto células marcadoras de estágios diferentes da inflamação, quanto manteve aumento de macrófagos, que existe desde o uso de AINE sem estado de não-inflamação⁹.

Outra explicação possível para o efeito analgésico observado neste modelo de dor inflamatória é a quantidade de neutrófilos e macrófagos, pois podem representar aumento de células com peptídeos opióides endógenos. Porém, avaliações adicionais tornam-se necessárias, já que a antinocicepção é limitada durante a inflamação inicial pelo número de receptores opióide e não pelo número de leucócitos contendo peptídeos opióides endógenos⁵.

Uma possibilidade ainda a ser aventada é o controle antinociceptivo por atuação do EHCA em outros fatores como bradicininas, prostaglandinas, fator de crescimento neuronal e citocinas. Há participação destes nos mecanismos de dor e analgesia, inclusive com indícios que quimiocinas (que são citocinas quimiotáticas), promovam a migração de células imunes e astrócitos, e induzam à proliferação de micróglia, células todas essas envolvidas na transmissão nociceptiva⁸.

CONCLUSÕES

Neste estudo foi demonstrado o efeito antinociceptivo do EHCA com dose inferior às relatadas anteriormente, associando-o às alterações do perfil de leucócitos. Esses dados sugerem uma resposta analgésica imunologicamente relacionada. Avaliações adicionais são necessárias para compreensão desse efeito e o potencial analgésico ainda precisa ser confirmado em outros modelos de dor.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro ao projeto e pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Agra MdF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PFd, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev Brasil Farmacog 2008; 18:472-508.
2. Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho JM. Plants with central analgesic activity. Phytomedicine 2001; 8(4):310-322.
3. Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. PNAS 2000; 97(18):10272-10276.
4. Bars DL, Gozariu M, Cadden SW. Animal Models of Nociception. Pharmacol Rev 2001; 53(4):597-652.
5. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Shaqura M, Mousa SA, Labuz D et al. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. Pain. 2004; 108(1-2):67-75.
6. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. Eur J Pain 2006; 10(4):287-333.
7. Brune K, Hinz B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. Arthritis Rheum 2004; 50(8):2391-2399.
8. Catherine A. Chemokines, chemokine receptors and pain. Trends Immunol 2005; 26(10):529-534.
9. Cho J. Immunomodulatory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the clinically available doses. Arch Pharm Res 2007; 30(1):64-74.
10. Cruz GVB, Pereira PVS, Patrício FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. J Ethnopharmacol 2007; 111: 148-154.
11. Dai Y, Ye WC, Wang ZT, Matsuda H, Kubo M, But PP. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. in mice. J Ethnopharmacol 2002; 81(2):245-250.
12. de Vasconcelos DIB, Leite JA, Carneiro LT, Piuvezam MR, de Lima MR, de Moraes LC, et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Ouabain in Mice. Mediators Inflamm 2011; 2011:1-11.
13. Elliott AM, Smith BH, Penny KI, Cairns Smith W, Alastair Chambers W. The epidemiology of chronic pain in the community. Lancet 1999; 354(9186):1248-1252.
14. Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. J Ethnopharmacol 2002; 81(1):11-16.
15. Goodwin JS, Ceuppens JL. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on immune function. Seminars Arthritis Rheum 1983; 13(Supplement 1):134-143.
16. Gordon B-M. Pain-like behaviours in animals – how human are they? Trends Pharm Sci 2004; 25(6):299-305.
17. Hajhashemi V, Ghannadi A, Mousavi S. Antinociceptive study of extracts of *Platanus orientalis* leaves in mice. Res Pharm Sci 2011; 6(2):123-128.
18. Harbone JB. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.: Chapman and Hall; 1984.
19. Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today 2000; 5(7):294-300.

20. Hasselström J, Liu-Palmgren J, Rasjö-Wrååk G. Prevalence of pain in general practice. *Eur J Pain* 2002; 6(5):375-385.
21. Ibrionke GF, Ajiboye KI. Studies on the Anti-Inflammatory and Analgesic Properties of *Chenopodium ambrosioides* Leaf Extract in Rats. *Int J Pharmacol* 2007; 3(1):111-115.
22. Jardim C, Jham G, Dhingra O, Freire M. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem Ecol* 2008;34:1213-1218.
23. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(3):206-220.
24. Loeser JD, Treede R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008; 137(3):473-477.
25. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the Immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(7):521-532.
26. McCurdy CR, Scully SS. Analgesic substances derived from natural products (naturreceuticals). *Life Sci* 2005; 78(5):476-484.
27. Mogil JS, Davis KD, Derbyshire SW. The necessity of animal models in pain research. *Pain* 2010; 151(1):12-17.
28. Nascimento FRF, Rodríguez D, Gomes E, Fernvik EC, Russo M. A method for multiple sequential analyses of macrophage functions using a small single cell sample. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1221-1226.
29. Nascimento FRF, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci* 2006;78(22):2650-2653.
30. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 2007; 70(3):461-477.
31. O'Brien T, Breivik H. The impact of chronic pain—European patients' perspective over 12 months. *Scand J Pain* 2012; 3(1):23-29.
32. Palermo-Neto J, Fonseca ESM, Quinteiro-Filho WM, Correia CSC, Sakai M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. *Physiol Behavior.* 2008;95(3):435-440.
33. Patrício FJ, Costa GC, Pereira PV, Aragao-Filho WC, Sousa SM, Frazao JB, et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol* 2008; 115(2):313-319.
34. Pereira WS, Ribeiro BP, Sousa AI, Serra IC, Mattar NS, Fortes TS, et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *J Ethnopharmacol* 2010; 127(3):602-605.
35. Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain.* 2001; 89(2-3):221-227.
36. Rittner H, Brack A. Leukocytes as mediators of pain and analgesia. *Cur Rheumatol Rep* 2007; 9(6):503-510.
37. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, et al. Opioid Peptide-expressing Leukocytes: Identification, Recruitment, and Simultaneously Increasing Inhibition of Inflammatory Pain. *Anesthesiol* 2001; 95(2):500-508.
38. Rittner HL, Labuz D, Richter JF, Brack A, Schäfer M, Stein C, et al. CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules *in vitro* and *in vivo*. *Brain Behav Immun* 2007; 21(8):1021-1032.
39. Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Brit J Anaesthesia* 2008;101(1):40-44.

40. Saastamoinen P, Leino-Arjas P, Laaksonen M, Lahelma E. Socio-economic differences in the prevalence of acute, chronic and disabling chronic pain among ageing employees. *Pain* 2005;114(3):364-371.
41. Smith BH, Elliott AM, Chambers WA, Smith WC, Hannaford PC, Penny K. The impact of chronic pain in the community. *Family Pract* 2001; 18(3):292-299.
42. Yunes RA, Cechinel Filho V, Ferreira J, Calixto JB. The use of natural products as sources of new analgesic drugs. In: Atta ur R, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Volume 30: Elsevier; 2005:191-212.
43. Zöllner C, Mousa SA, Fischer O, Rittner HL, Shaqura M, Brack A et al. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 2008; 118(3):1065-1073.

***Autora para correspondência:**

Prof^a Dra Flávia Nascimento

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br