



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DANIELLE GOMES SANTANA**

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Caesalpinia  
pyramidalis* Tul. NA PANCREATITE AGUDA EM RATOS**

**ARACAJU**

**2011**

**DANIELLE GOMES SANTANA**

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*Caesalpinia pyramidalis* Tul. NA PANCREATITE  
AGUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Enilton A. Camargo

**ARACAJU**

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S231e Santana, Danielle Gomes  
Efeito do extrato etanólico de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. na pancreatite aguda em ratos / Danielle Gomes Santana. – São Cristóvão, 2011.  
134 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Enilton A. Camargo.

1. Pancreatite. 2. *Caesalpinia pyramidalis*. 3. Planta medicinal.  
4. Hiperalgesia. I. Título.

CDU616.37:582.736.2

**DANIELLE GOMES SANTANA**

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*Caesalpinia pyramidalis* Tul. NA PANCREATITE  
AGUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Aprovada em 21/10/2011**

---

**Orientador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo**

---

**1º Examinador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto**

---

**2º Examinador: Profa. Dra. Josimari Melo de Santana**

**PARECER**

---

---

---

---

---

---

---

## DEDICATÓRIA

*A Deus, Dono dos meus dons, por  
tudo que tenho e sou.*

*Aos meus pais, Seu Raimundo e  
Dona Léa, pelo sacrifício de vida  
em prol da minha educação, pelo  
exemplo de decência e coragem e  
por não me deixarem ter medo da  
vida.*

*Ao meu Cléo, amado, parceiro,  
amigo, pela presença em todos os  
momentos, pela força nas  
dificuldades e, sobretudo, pela luz  
que trouxe à minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, prof. Enílton Camargo, pela confiança que depositou em mim ao me aceitar como sua aluna, pela competência, sabedoria e paciência com que conduziu este trabalho, estando sempre presente, e por tudo o que me ensinou.*

*À minha família, com um carinho especial aos meus irmãos Fafá e Silvinho e à minha cunhada Du, à família de Cléo, aos meus tios, tias, primos, e demais “parentes e aderentes” que estiveram sempre por perto dando “aquela força”.*

*Aos colegas de laboratório, sempre dispostos a ajudar, nem que fosse com um bom papo, pela torcida e pelo carinho, em especial a Denisson e Janaina.*

*Aos professores que gentilmente colaboraram com este trabalho, Sara Thomazzi, Charles Estevam e Paulo César Nogueira.*

*A todos os amigos do mestrado, aqui simbolizados pelas minhas madrinhas Rejane e Roberta, pelas boas conversas, pela amizade construída ao longo desses 2 anos, foi uma honra ter vocês por perto neste período tão importante.*

*Aos incontáveis amigos da UFS, meus “amiguinhos” do LADef e de todos os outros laboratórios e setores com os quais sempre posso contar.*

*A JP, por estar presente (bisgando) em quase todos os meus experimentos, me dizendo que o ducto pancreático dos ratos não existia.*

*A PS e Aline Barros, um casal porreta, pelas ótimas conversas, pelo incentivo e pela confiança.*

*Aos meus amigos de Estância, de Aracaju, da Paraíba, da Crisma, que mesmo espalhados continuam sempre juntos de mim.*

*A Allan, pela ajuda com as análises cromatográficas e pela paciência com os milhões de e-mails enviados.*

*Ao chefe do DFS, prof. Charles, pelo incentivo institucional à realização deste mestrado e aos professores Rogéria, Ana Amélia e Paulo Sérgio pela compreensão e pelos ensinamentos. À dona Jane e seu Osvaldo, sempre alegres e prestativos.*

*À UFS e ao NPGME pelo espaço e pela oportunidade dada a todos os alunos, e à gentil Izabela.*

*Aos ratos, cujas vidas foram interrompidas para a realização deste trabalho.*

*“Afinal, há é que ter paciência,  
dar tempo ao tempo,  
já devíamos ter aprendido,  
e de uma vez para sempre,  
que o destino tem de fazer muitos rodeios  
para chegar a qualquer parte.”*

**(José Saramago)**

## RESUMO

SANTANA, Danielle Gomes. Efeito do extrato etanólico de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. na pancreatite aguda em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) UFS/SE, Aracaju, 2011. A pancreatite aguda (PA) é uma doença inflamatória do pâncreas que geralmente se apresenta acompanhada de dor abdominal e possui elevada mortalidade nas suas formas mais graves. Não há terapia específica para tratar esta doença, ou as complicações pulmonares decorrentes dela, o que torna de interesse a busca de novas substâncias para a sua terapêutica. Neste âmbito, o uso de plantas medicinais pode ser uma estratégia viável para tratar esta condição inflamatória, bem como a dor a ela associada. Neste estudo investigou-se, portanto, o efeito do extrato etanólico da entrecasca de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) (EECp) na PA induzida pela obstrução do ducto biliopancreático (ODBP). Inicialmente foi realizada a análise cromatográfica do extrato pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para efeito de estudo, os grupos de animais foram eutanasiados 6 (protocolo 1) ou 24 h (protocolo 2) após a indução da PA. Ratos machos Wistar (200-250 g, n=6-8 por grupo) foram pré-tratados pela via oral com EECp (100, 200 ou 400 mg/kg, protocolo 1 ou 400 mg/kg, protocolo 2) ou veículo (tween 80 0,2% em salina 0,9%) 1 h antes e 12 h após a indução da PA ou falsa cirurgia (*sham*). Antes (-1 h) e após 6, 12 ou 24 h, foram realizadas medidas da hiperalgesia abdominal com o von Frey eletrônico. A atividade locomotora dos animais foi avaliada pelo teste do campo aberto. Após eutanásia e coleta dos tecidos, determinou-se a atividade de mieloperoxidase (MPO) e a concentração de malondialdeído (MDA) em pâncreas e pulmão, o índice de edema pancreático, as concentrações séricas de amilase, lipase e nitrato/nitrito e a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue. A análise cromatográfica do extrato sugeriu a presença do flavonóide rutina em sua composição. Em ambos os protocolos experimentais (6 ou 24 h), a ODBP aumentou significativamente todos os parâmetros inflamatórios e bioquímicos avaliados, quando comparados ao respectivo grupo *sham*. Os dados obtidos neste estudo permitem afirmar que os efeitos causados pelo EECp, na pancreatite induzida pela ODBP, incluem (i) a redução da inflamação pancreática, devido a inibição do infiltrado de neutrófilos e do edema pancreáticos; (ii) a atenuação da inflamação sistêmica, através do decréscimo da contagem de leucócitos no sangue periférico, bem como, da redução do infiltrado de neutrófilos pulmonar, em especial, nos estágios iniciais da pancreatite; (iii) a diminuição da peroxidação lipídica pancreática e pulmonar, o que pode contribuir para os efeitos anti-inflamatórios observados nestes tecidos; (iv) a diminuição dos níveis séricos de nitrato/nitrito; (v) a redução parcial dos níveis de amilase e lipase e (vi) a inibição da hiperalgesia abdominal, um efeito que persiste por no mínimo 12 h com a maior dose de EECp utilizada e é confirmado pela ausência de alteração da atividade locomotora dos animais no campo aberto. Os resultados demonstram que o EECp diminui a inflamação e a hiperalgesia durante a PA induzida por ODBP. Estas atividades são de interesse para o desenvolvimento de estudos ou abordagens futuras para o tratamento da PA em humanos.

**Palavras-chave:** pancreatite, *Caesalpinia pyramidalis*, hiperalgesia.

## ABSTRACT

Acute pancreatitis (AP) is a pancreatic inflammatory disease that usually occurs associated with abdominal pain and presents high mortality in its severe form. There is no specific therapy to treat this disease, as well as the secondary lung injury, which makes of interest the search for new substances to treat AP. In this context, the use of medicinal plants can be a reasonable strategy to treat this inflammatory condition and the associated pain. We investigated therefore the effect of ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) (EECp) on AP induced by common bile duct obstruction (CBDO). Firstly, chromatographic analysis of the EECp was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Groups of male Wistar rats (200-250 g, n = 6-8 per group) were submitted to CBDO and euthanized 6 (protocol 1) or 24 h (protocol 2) thereafter. Animals were orally treated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg, protocol 1, or 400 mg/kg, protocol 2) or vehicle (Tween 80, 0.2% in saline 0.9%) 1 h before and 12 h after induction of AP or false surgery (sham). Before (-1 h) and after 6, 12 or 24 h, the abdominal hyperalgesia was measured using the electronic von Frey. The locomotor activity of the animals was evaluated by the open field test. After euthanasia and tissue collection the following parameters were measured: (i) the activity of myeloperoxidase (MPO) in pancreas and lung, (ii) the concentration of malondialdehyde (MDA) in pancreas, lung, liver, and kidney, (iii) the pancreatic edema index, (iv) serum amylase, lipase, and nitrate/nitrite and (v) the total and differential leukocyte count in peripheral blood. The chromatographic analysis of EECp suggested that rutin is present in this extract. In both protocols 1 and 2 the CBDO significantly increased all inflammatory and biochemical parameters evaluated, when compared to sham group. The effects caused by EECp on CBDO-induced pancreatitis include the reduction of pancreatic inflammation, because of inhibition of neutrophil infiltration, and pancreatic edema, attenuation of systemic inflammation, by decreasing the leukocyte counts in peripheral blood, as well as reducing the pulmonary neutrophil infiltration, especially in the initial stages of pancreatitis. Also, the EECp decreased the pancreatic and lung lipid peroxidation and the serum nitrate/nitrite, which may contribute to the anti-inflammatory effects observed in these tissues and it partially reduced the amylase and lipase levels. Abdominal hyperalgesia induced by CBDO was completely inhibited by EECp (400 mg/kg), an effect that persists for at least 12 h. No alterations were observed in the locomotor activity of rats treated with EECp in the open field. The results showed that EECp decreases the inflammatory and nociceptive responses in CBDO-induced AP. These activities make this extract of interest to the development of studies or approaches for the treatment of this condition in humans.

**Keywords:** pancreatitis, *Caesalpinia pyramidalis*, hyperalgesia.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Hábito de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. (Fabaceae).....                                                                                                                                                                   | 33 |
| Figura 2. Linha do tempo referente ao protocolo 1 de tratamento da pancreatite induzida por ODBP.....                                                                                                                                     | 38 |
| Figura 3. Linha do tempo referente ao protocolo 2 de tratamento da pancreatite induzida por ODBP.....                                                                                                                                     | 39 |
| Figura 4. Cromatogramas representativos (254 nm) do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp; A) e dos padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleína (E).....                                           | 46 |
| Figura 5. Cromatogramas representativos (254 nm) do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp; A) fortificado com os padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleína (E).....                              | 47 |
| Figura 6. Efeito do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na atividade de mieloperoxidase (MPO) em pâncreas (A) ou pulmão (B)..... | 48 |
| Figura 7. Efeito do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração de malondialdeído (MDA) em pâncreas (A) ou pulmão (B)... | 51 |
| Figura 8. Efeito do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração de nitrato e nitrito (NO <sub>x</sub> ) no soro.....     | 52 |
| Figura 9. Efeito do extrato etanólico da <i>Caesalpinia pyramidalis</i> (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de amilase (A) ou lipase (B) séricas.....                    | 54 |

Figura 10. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de mieloperoxidase (MPO) em pâncreas (A) ou pulmão (B).....56

Figura 11. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na concentração de malondialdeído (MDA) em pâncreas (A) ou pulmão (B)...58

Figura 12. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração sérica de nitrato e nitrito ( $\text{NO}_x^-$ ).....60

Figura 13. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de amilase (A) ou lipase (B) séricas.....61

Figura 14. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) na hiperalgesia abdominal durante a pancreatite induzida por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).....64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Contagem leucocitária total e diferencial no sangue periférico de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).....49

Tabela 2. Concentração de MDA em fígado e rim de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).....52

Tabela 3. Contagem leucocitária total e diferencial no sangue periférico de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).....57

Tabela 4. Concentração de MDA em fígado e rim de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).....59

Tabela 5. Ausência de efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) na atividade locomotora de ratos no campo aberto.....65

Tabela 6. Resumo dos efeitos do extrato etanólico de *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) sobre a pancreatite aguda induzida por ODBP em ratos.....66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                       |                                                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>ACN</b>            | acetonitrila                                                      |
| <b>ANOVA</b>          | análise de variância                                              |
| <b>BHT</b>            | butil-hidroxitolueno                                              |
| <b>CEPA</b>           | Comitê de Ética em Pesquisa Animal                                |
| <b>CGRP</b>           | peptídeo relacionado ao gene da calcitonina                       |
| <b>CLAE</b>           | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                          |
| <b>DAG</b>            | diacilglicerol                                                    |
| <b>DNA</b>            | ácido desoxirribonucléico                                         |
| <b>DPPH</b>           | 2,2-difenil-1-picrilidrazil                                       |
| <b>EECp</b>           | extrato etanólico da entrecasca de <i>Caesalpinia pyramidalis</i> |
| <b>eNOS</b>           | óxido nítrico sintase endotelial                                  |
| <b>EPM</b>            | erro padrão da média                                              |
| <b>ERC</b>            | espécies reativas de cloro                                        |
| <b>ERN</b>            | espécies reativas de nitrogênio                                   |
| <b>ERO</b>            | espécies reativas de oxigênio                                     |
| <b>FAD</b>            | flavina adenosina dinucleotídeo                                   |
| <b>IASP</b>           | Associação Internacional para Estudo da Dor                       |
| <b>ICAM-1</b>         | molécula de adesão intercelular-1                                 |
| <b>IL</b>             | interleucina                                                      |
| <b>iNOS</b>           | óxido nítrico sintase induzível                                   |
| <b>i.p.</b>           | intraperitoneal                                                   |
| <b>IP<sub>3</sub></b> | 1,4,5-trifosfato de inositol                                      |
| <b>LPS</b>            | lipopolissacarídeo de parede bacteriana                           |

|                         |                                                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>MDA</b>              | malondialdeído                                              |
| <b>MPO</b>              | mieloperoxidase                                             |
| <b>NADPH</b>            | fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina          |
| <b>NF-κB</b>            | fator nuclear-κB                                            |
| <b>NK</b>               | neurocinina                                                 |
| <b>nNOS</b>             | óxido nítrico sintase neuronal                              |
| <b>NO</b>               | óxido nítrico                                               |
| <b>ODBP</b>             | obstrução do ducto biliopancreático                         |
| <b>OMS</b>              | Organização Mundial da Saúde                                |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b> | peroxinitrito                                               |
| <b>PAF</b>              | fator de agregação plaquetária                              |
| <b>PG</b>               | prostaglandina                                              |
| <b>PLA<sub>2</sub></b>  | fosfolipase A <sub>2</sub>                                  |
| <b>PLC</b>              | fosfolipase C                                               |
| <b>PPAR-γ</b>           | receptores ativados pelo proliferador do peroxissomo gama   |
| <b>SBCAL</b>            | Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório |
| <b>SP</b>               | substância P                                                |
| <b>SUS</b>              | Sistema Único de Saúde                                      |
| <b>TBA</b>              | ácido tiobarbitúrico                                        |
| <b>TBARS</b>            | substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico                |
| <b>TCA</b>              | ácido tricloroacético                                       |
| <b>TNF</b>              | fator de necrose tumoral                                    |
| <b>UMPO</b>             | unidades de mieloperoxidase                                 |
| <b>UV</b>               | ultravioleta                                                |
| <b>v.o.</b>             | via oral                                                    |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                           | <b>16</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                | <b>18</b> |
| 2.1      | Pancreatite Aguda.....                                                                                                           | 18        |
| 2.2      | Modelo de Pancreatite Aguda por Obstrução do Ducto Biliopancreático.....                                                         | 21        |
| 2.3      | Mediadores Inflamatórios na Pancreatite Aguda.....                                                                               | 23        |
| 2.3.1    | Citocinas.....                                                                                                                   | 24        |
| 2.3.2    | Radicais Livres.....                                                                                                             | 25        |
| 2.4      | Dor na Pancreatite Aguda.....                                                                                                    | 28        |
| 2.5      | Produtos Naturais .....                                                                                                          | 31        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                            | <b>34</b> |
| 3.1      | Objetivo Geral.....                                                                                                              | 34        |
| 3.2      | Objetivos Específicos.....                                                                                                       | 34        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                   | <b>35</b> |
| 4.1      | Reagentes e Drogas.....                                                                                                          | 35        |
| 4.2      | Coleta e Identificação da Planta.....                                                                                            | 35        |
| 4.3      | Preparação do Extrato Etanólico.....                                                                                             | 35        |
| 4.4      | Análise Cromatográfica do EECp.....                                                                                              | 36        |
| 4.5      | Animais.....                                                                                                                     | 37        |
| 4.6      | Procedimento Experimental de Indução da Pancreatite por ODBP.....                                                                | 37        |
| 4.7      | Delineamento Experimental.....                                                                                                   | 38        |
| 4.8      | Medida da Hiperalgesia Abdominal.....                                                                                            | 40        |
| 4.9      | Determinação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) em Pâncreas e Pulmão.....                                                     | 41        |
| 4.10     | Determinação do Conteúdo Tecidual de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em Pâncreas, Pulmão, Fígado e Rim..... | 42        |
| 4.11     | Determinação de Metabólitos do NO (NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> ).....                                                           | 42        |
| 4.12     | Determinação de Amilase e Lipase Séricas.....                                                                                    | 43        |
| 4.13     | Medida do Índice de Edema Pancreático.....                                                                                       | 43        |

|       |                                                                                                                                         |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.14  | Determinação da Contagem Total e Diferencial de Leucócitos..                                                                            | 43 |
| 4.15  | Estudo da Atividade Locomotora (teste do campo aberto).....                                                                             | 44 |
| 4.16  | Análise Estatística.....                                                                                                                | 44 |
| 5     | RESULTADOS.....                                                                                                                         | 46 |
| 5.1   | Análise Cromatográfica do EECp.....                                                                                                     | 46 |
| 5.2   | Efeito do EECp Sobre os Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios Avaliados 6 h Após a Indução da Pancreatite por ODBP.....                | 47 |
| 5.2.1 | <i>Atividade de MPO, Índice de Edema e Contagem Total e Diferencial dos Leucócitos.....</i>                                             | 47 |
| 5.2.2 | <i>Determinação de TBARS e de <math>\text{NO}_x^-</math>.....</i>                                                                       | 50 |
| 5.2.3 | <i>Níveis de Amilase e Lipase Séricas.....</i>                                                                                          | 52 |
| 5.3   | Efeito do EECp Sobre os Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios Avaliados 24 h Após a Indução da Pancreatite por ODBP.....               | 55 |
| 5.3.1 | <i>Atividade de MPO, índice de Edema e Contagem Total e Diferencial dos Leucócitos.....</i>                                             | 55 |
| 5.3.2 | <i>Determinação de TBARS e de <math>\text{NO}_x^-</math>.....</i>                                                                       | 57 |
| 5.3.3 | <i>Atividade de Amilase e Lipase Séricas.....</i>                                                                                       | 60 |
| 5.4   | Efeito do EECp Sobre a Hiperalgesia Abdominal Durante a Pancreatite Aguda Induzida por ODBP e Sobre a Atividade Motora dos Animais..... | 62 |
| 5.5   | Sumário dos resultados obtidos com os tratamentos.....                                                                                  | 65 |
| 6     | DISCUSSÃO.....                                                                                                                          | 67 |
| 7     | CONCLUSÃO.....                                                                                                                          | 77 |
| 8     | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                        | 78 |
|       | ANEXO I.....                                                                                                                            | 88 |
|       | ANEXO II.....                                                                                                                           | 89 |

# 1 INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda, doença inflamatória do pâncreas, envolve uma complexa sequência de eventos fisiopatológicos que se desenvolvem rapidamente, gerando alterações hemodinâmicas e resposta inflamatória sistêmica (FROSSARD, STEER, PASTOR, 2008). Como parte do quadro inflamatório, a dor é um importante sintoma relatado pelos pacientes com pancreatite cujo tratamento ainda carece de estratégias terapêuticas mais eficazes (CEYHAN et al., 2008).

O rápido curso da doença e a relativa inacessibilidade do pâncreas ao exame físico tornam difíceis as investigações clínicas sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos estágios iniciais da pancreatite aguda (PANDOL et al., 2007). Vários modelos de pancreatite em animais de experimentação foram desenvolvidos a fim de elucidar os eventos fisiológico-moleculares iniciais desta doença, para que se possam identificar possíveis alvos para intervenções terapêuticas (WANG et al., 2009). Dentre eles, destaca-se a indução da pancreatite pela obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), um modelo caracterizado por um quadro inflamatório pancreático e pulmonar que se assemelha à condição clínica observada em humanos, principalmente mimetizando a pancreatite induzida por litíase (SAMUEL et al., 1994).

O tratamento da pancreatite aguda é prioritariamente sintomático e baseado na avaliação precoce da gravidade da doença, com o objetivo de controlar a dor, oferecer terapia de suporte, suprir as necessidades nutricionais, monitorar as complicações e prevenir a infecção pancreática e a disseminação do processo inflamatório para outros órgãos, de modo que não há tratamento farmacológico específico direcionado ao mecanismo fisiopatológico subjacente (BANG et al., 2008). Esta ausência de terapia específica para tratar a pancreatite aguda e as altas taxas de mortalidade observadas nos quadros mais graves da doença tornam esta condição patológica de interesse para

estudos experimentais baseados na busca por novas alternativas de tratamento, como a descoberta de novos fármacos.

Dentre as fontes de princípios ativos medicamentosos, os produtos naturais se destacam pelo importante papel que vêm desempenhando ao longo dos anos na descoberta de novas drogas (HARVEY, 2008), com relevância para o Brasil, por ser o país com a maior diversidade de espécies no mundo, abrangendo seis biomas terrestres e três grandes ecossistemas marinhos, além de pelo menos 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais atualmente conhecidas no país (BRASIL, 2011). Entre os biomas existentes, destaca-se a caatinga, que compreende uma rica fonte de plantas com potencial medicinal (ALBUQUERQUE, 2007).

O desenvolvimento de atividades de pesquisa envolvendo o estudo dos produtos naturais, principalmente tomando-se como base o conhecimento popular, deve ser de interesse prioritário para o desenvolvimento regional (AGRA et al., 2008). Neste sentido, a *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), uma planta utilizada popularmente na forma de decocto para o tratamento de condições inflamatórias (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007), foi alvo de um estudo farmacológico recente de Santos *et al.* (2011), o qual demonstrou que o extrato etanólico da entrecasca desta planta possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em roedores, o que justifica a investigação do seu possível efeito benéfico em uma condição inflamatória e nociceptiva mais complexa como a pancreatite aguda.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Pancreatite Aguda**

O pâncreas é uma glândula localizada atrás do estômago, entre o duodeno e o baço, que possui duas porções funcionais distintas, a exócrina e a endócrina (KIBA, 2004). A porção endócrina constitui-se das ilhotas pancreáticas que produzem insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídios pancreáticos, que mantêm, por exemplo, a homeostase orgânica da glicose, enquanto que a porção exócrina contém túbulos que são cercados de células piramidais adjacentes, as células acinares, formando os ácinos, que são rodeados por tecido conjuntivo, dando suporte a uma rede de capilares e terminações nervosas (LEUNG, IP, 2006).

O pâncreas dos mamíferos é embriologicamente derivado do intestino anterior primitivo e é ricamente innervado por uma variedade de fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas, fibras espessas de nervos e agregados de corpos celulares conhecidos como gânglios intrapancreáticos (NATHAN et al., 2002). Estas estruturas são dispostas pelo parênquima pancreático e representam o componente neural intrínseco na distribuição nervosa pancreática, cujas principais funções são estimular as células pancreáticas à secreção enzimática e regular a motilidade do órgão. Os principais componentes extrínsecos deste órgão são anatomicamente identificados no nervo vago e no tronco do nervo esplênico (KIBA, 2004). As fibras simpáticas e parassimpáticas chegam ao pâncreas passando ao longo das artérias do plexo celíaco e do plexo mesentérico superior, sendo distribuídas para as células acinares e ilhotas pancreáticas (BEHRMAN, FOLWER, 2007). Estas fibras transmitem a informação pela via parassimpática (nervo vago) ou simpática (nervo esplênico) e participam da regulação das funções endócrina e exócrina, bem como da transmissão sensorial da dor (NOBLE, LIDDLE, 2005).

Segundo a classificação do Simpósio de Atlanta de 1992, a pancreatite aguda é definida como um processo inflamatório agudo do pâncreas que pode envolver tecidos peripancreáticos e/ou sistemas orgânicos distantes (BRADLEY, 1993). Esta doença responde por mais de 200 mil admissões hospitalares a cada ano nos EUA (WHITCOMB, 2006), com uma incidência anual variando de 5 a 80 para cada 100 mil habitantes (ABELA, CARTER, 2010). Em 80% dos pacientes, a pancreatite se apresenta de forma leve a moderada e pode ser tratada sem maiores complicações, mas em 20% dos pacientes acometidos, a pancreatite pode ser grave, com necrose pancreática e/ou peripancreática, acompanhada de quadro infeccioso e apresenta alta mortalidade, que pode atingir 75% dos casos (McKAY, BUTTER, 2003).

De maneira geral, a pancreatite aguda é considerada uma doença potencialmente fatal com taxa de mortalidade em torno de 5%, a depender da gravidade da doença (PANDOL et al., 2007). Cerca de metade das mortes acontecem dentro da primeira semana após o início dos sintomas (SPANIER, DIJKGRAAF, BRUNO, 2008), principalmente devido à “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” secundária à infecção pancreática, com subsequente falência múltipla dos órgãos (ABELA, CARTER, 2010). A prevalência de complicações pulmonares na pancreatite aguda oscila entre 15 a 55% e sua gravidade varia desde a hipoxemia sem agravamento clínico até a síndrome da angústia respiratória do adulto, o que significa um aumento no risco de morte (AL MOFLEH, 2008), de modo que 60% dos óbitos ocorridos na primeira semana estão associadas à síndrome da angústia respiratória do adulto e a outras complicações pulmonares (ZHOU et al., 2010).

Existem muitas causas para a pancreatite aguda, que podem ser facilmente identificadas na maioria dos pacientes. Entre as mais comuns estão a obstrução do ducto biliar por cálculos (38%) e o abuso de álcool (36%) (ABELA, CARTER, 2010). A obstrução pode ocorrer no ducto biliar, no ducto pancreático ou em ambos, levando à pancreatite por aumento da pressão ductal e subsequente desregulação da ativação das enzimas pancreáticas (WANG et al., 2009). O consumo excessivo frequente de álcool pode facilitar a ativação intrapancreática de tripsina levando à morte dos ácinos pancreáticos,

tanto por necrose quanto por apoptose (PAPACHRISTOU, 2008). Nos demais quadros, as causas podem ser hipertrigliceridemia, trauma, hipercalcemia, microlitíases, fatores iatrogênicos ou idiopáticos (ABELA, CARTER, 2010). Como a gravidade da pancreatite aguda varia de acordo com a etiologia, e por não haver uma terapia específica e efetiva, o tratamento é principalmente de suporte (WHITCOMB, 2006).

Independente da etiologia, a fisiopatologia da pancreatite aguda envolve uma cascata complexa de eventos (BATHIA et al., 2000) e pode ser considerada em três fases. Na primeira fase há a ativação do tripsinogênio em tripsina no interior dos ácinos pancreáticos (FROSSARD, STEER, PASTOR, 2008). Para tanto, uma série de mecanismos têm sido propostos como a interrupção da sinalização de cálcio, conversão do tripsinogênio à tripsina pela catepsina-B e diminuição da atividade do inibidor intracelular de tripsina pancreática (MOOREN et al., 2003; BANKS, FREEMAN, 2006). Após a ativação do tripsinogênio em tripsina ativa no interior das células acinares, diversas enzimas, como a amilase, a lipase, a elastase e a fosfolipase (PL) A<sub>2</sub>, e as vias do sistema complemento e das cininas são ativadas (BANG et al., 2008).

Na segunda fase, há uma inflamação intrapancreática que ocorre por diversos mecanismos (BATHIA, 2005). A resposta inflamatória é causada em parte pela liberação de quimiocinas da célula acinar, que é seguida pelo recrutamento de linfócitos T e de macrófagos levando ao edema pancreático e ao acúmulo de neutrófilos (BANG et al., 2008). A liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, leva a um processo inflamatório sistêmico que é acompanhado de edema intersticial (DIOS, 2010).

Na terceira fase, as alterações patológicas no pâncreas contribuem para a liberação de enzimas pancreáticas ativas na corrente sanguínea, estimulando a produção de citocinas inflamatórias, como interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8 de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (AL MOFLEH, 2008). A liberação dessas interleucinas e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  de macrófagos desencadeia uma cascata inflamatória que pode levar à síndrome da angústia

respiratória (BATHIA et al., 2000). Em todas as fases, existem quatro passos importantes no processo inflamatório do pâncreas, a saber: i) ativação de células inflamatórias, ii) quimiotaxia de células inflamatórias para a microcirculação local, iii) ativação das moléculas de adesão, permitindo a ligação de células inflamatórias ao endotélio e iv) migração de leucócitos ativados para as áreas inflamadas (BANKS, FREEMAN, 2006).

Dentre os eventos descritos, a ativação prematura de enzimas pancreáticas é considerada crucial para o desenvolvimento da pancreatite aguda (FROSSARD, STEER, PASTOR, 2008). A secreção dessas enzimas é controlada por complexos mecanismos neuro-hormonais ativados durante a ingestão de alimento, que incluem a ativação do tripsinogênio (JAWOREK et al., 2010). Um dos indicadores bioquímicos mais utilizados no diagnóstico da pancreatite aguda é a dosagem dos níveis de amilase sérica, de modo que um aumento nos níveis deste biomarcador é aceito para embasar um diagnóstico de pancreatite aguda (ÇOL et al., 2010). A amilase pode estar falsamente elevada em uma série de condições patológicas não pancreáticas, incluindo insuficiência renal e macroamilasemia (FORSMARK, BAILLIE, 2007). Outro indicador bioquímico importante nos quadros de pancreatite aguda é a lipase, cuja elevação é mais específica para o diagnóstico, em comparação com os níveis de amilase, no entanto, a observação destes dois parâmetros apenas, não é suficiente para o diagnóstico completo da pancreatite aguda (FORSMARK, BAILLIE, 2007). O aumento do valor dos níveis séricos de amilase é a primeira alteração bioquímica observada, no entanto, os níveis desta enzima decrescem a valores próximos do normal mais rapidamente que os níveis de lipase, que se elevam posteriormente em relação à amilase, mas também decrescem em tempos mais tardios (OREBAUGH, 1994).

## **2.2 Modelo de Pancreatite Aguda por Obstrução do Ducto Biliopancreático**

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória que desenvolve uma complexa cascata de eventos patológicos, com impacto não apenas na

patogênese, como também no curso da doença (YOSHINAGA, WASHIZUKA, SEGAWA, 2000). Atualmente, está bem estabelecido que a pancreatite aguda está associada à autodigestão do pâncreas, como consequência da ativação intrapancreática prematura de enzimas proteolíticas secretadas por este órgão, de modo que a lesão das células acinares induz uma reação inflamatória local que pode levar à resposta inflamatória sistêmica, com falência funcional de outros órgãos, fenômenos estes que são observados tanto clínica quanto experimentalmente (DIOS et al., 2002).

Devido à rápida evolução e à relativa inacessibilidade do pâncreas ao exame físico durante a pancreatite, as investigações clínicas sobre o desenvolvimento desta doença e o efeito de possíveis novos tratamentos são bastante complicados, assim, modelos de pancreatite em animais são empregados a fim de esclarecer os passos moleculares iniciais para que se possam identificar possíveis alvos para intervenções terapêuticas (WANG et al., 2009).

O modelo de indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático é capaz de mimetizar os estágios iniciais da pancreatite por litíase em humanos, que é a principal causa clínica da pancreatite aguda (SAMUEL, 2005). Neste modelo, o acúmulo de enzimas digestivas no pâncreas ocorre devido à obstrução mecânica ductal, favorecendo a lesão das células acinares por estas enzimas, ao invés de sua secreção na forma inativada pelo ducto pancreático (MEYERHOLZ et al., 2008). Este modelo apresenta características de pancreatite hemorrágica, estando associado à lesão pulmonar, com presença de infiltração neutrofílica e perda da arquitetura tissular, além do aumento do número de macrófagos teciduais no pâncreas, acompanhado por edema, ativação de quinases envolvidas em vias de sinalização intracelular, elevação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) tecidual, além de fibrose pancreática e aumento do número de células apoptóticas (MEYERHOLZ et al., 2008). Observa-se também o aumento da atividade de amilase, tripsina e lipase séricos, bem como a queda dos níveis de glutathiona no pâncreas (DIOS, URUÑUELA, MANSO, 2003).

### **2.3 Componentes Inflamatórios na Pancreatite Aguda**

A imunidade inata tem um papel essencial nos estágios iniciais da pancreatite aguda por ser a primeira linha de defesa contra o estímulo inflamatório (TAMIZHSELVI et al., 2011). O recrutamento e a ativação de várias células inflamatórias intensificam a lesão acinar e levam ao aumento da produção de vários componentes inflamatórios como citocinas (PANDOL et al., 2007), mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária (PAF), fatores neurogênicos e radicais livres, além de moléculas de adesão, cujos mecanismos exatos de ação na inflamação pancreática e sistêmica ainda não foram completamente elucidados (BATHIA, 2005).

Uma característica marcante da pancreatite aguda é o acúmulo de neutrófilos no pâncreas que tem sido apontado como sendo modulador da gravidade da doença, tanto das alterações locais quanto sistêmicas (PANDOL et al., 2007). Neste processo, observa-se principalmente a infiltração de neutrófilos nos tecidos inflamados, para que isto ocorra, é necessário o desenvolvimento de uma sequência de mecanismos (rolagem, adesão e transmigração) nos quais um grande número de moléculas de adesão e de mediadores inflamatórios está envolvido (RAMUDO et al., 2007). Entre as moléculas de adesão envolvidas na fisiopatologia da pancreatite aguda, destaca-se a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que é expressa nas células endoteliais e é responsiva a inúmeros mediadores presentes na inflamação e no estresse oxidativo (SUN, WATANABE, WANG, 2006).

A presença dos neutrófilos no tecido pode ser avaliada tanto histologicamente, quanto através da atividade de MPO. Esta enzima está estocada nos grânulos azurófilos destas células (KLEBANOFF, 2005), o que permite estimar a sua infiltração no foco inflamatório através da dosagem da sua atividade (ARNHOLD, FLEMMIG, 2010), pois as concentrações teciduais da MPO estão relacionadas com o número de neutrófilos em um dado tecido (GENOVESE et al., 2006). Existem ainda evidências que sugerem um

importante papel da MPO na atividade antimicrobiana dos neutrófilos, bem como em diversas outras patologias (KLEBANOFF, 2005).

### *2.3.1 Citocinas*

Na resposta inflamatória local e sistêmica da pancreatite aguda os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 estão elevados e possuem um papel importante na patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica associada (AL MOFLEH, 2008). Vale destacar que os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, elevam-se nos estágios iniciais da doença (DIOS, 2010). A presença e a ação de citocinas já foram observadas em diversos estudos envolvendo o modelo de pancreatite aguda induzida por ODBP (OSMAN, GESSER et al., 2002, RAMUDO, MANSO et al., 2005; CHAN, LEUNG, 2009).

Entre as citocinas pró-inflamatórias relevantes durante o processo inflamatório da pancreatite aguda, destaca-se a IL-1 $\beta$  que é ativadora de neutrófilos e induz o aumento de moléculas de adesão, tanto nos leucócitos quanto no endotélio, auxiliando a propagação da resposta imune (SHRIVASTAVA, BHATIA, 2010). A IL-6 estimula a síntese de proteínas de fase aguda no fígado, cujos níveis estão elevados em pacientes com pancreatite aguda 48 h após o início dos sintomas (CHAN, LEUNG, 2009). Após ativação, a IL-6 tem um papel importante no seu próprio aumento e na cronificação do processo inflamatório devido à ação quimiotática de leucócitos mononucleares no foco inflamatório (BOUGUEN, CHEVAUX, PEYRIN-BIROULET, 2011). Além destas citocinas, o TNF- $\alpha$  também está envolvido no recrutamento de leucócitos, na modulação da geração de óxido nítrico (NO), na indução de outras citocinas pró-inflamatórias, na proliferação e diferenciação de células imunes, além de desempenhar outras ações no processo inflamatório (RAMUDO et al., 2005). No entanto, as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  não indicam a gravidade da pancreatite aguda, ao passo que o aumento dos níveis de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  na circulação é preditivo

da falência dos órgãos em pacientes com pancreatite aguda, mesmo quando os níveis de TNF- $\alpha$  não são detectados no plasma (BATHIA et al., 2000).

### 2.3.2 Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons que individualmente estejam ocupando um orbital atômico ou molecular. Estes radicais livres, que possuem o elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio, nitrogênio ou cloro são denominados, respectivamente, espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) ou de cloro (ERC) (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004).

O termo ERO inclui tanto os radicais de oxigênio como o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), quanto espécies não-radicalares que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $O_2^1\Delta g$ ). As ERN compreendem os radicais livres de nitrogênio como o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ , ou simplesmente NO, como será chamado de agora em diante) e as espécies não-radicalares como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Do mesmo modo, fazem parte das ERC o cloro radicalar ( $Cl^{\bullet}$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004).

Em condições normais, estas espécies são geradas nas células aeróbicas como subprodutos de uma série de reações metabólicas e são rapidamente removidas por sistemas antioxidantes existentes na própria célula (URUÑUELA et al., 2002). Quando a geração destas espécies reativas é superior à capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos, desenvolve-se o estresse oxidativo (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004), que provoca distúrbios na homeostase celular, uma vez que as ERO/N/C podem causar alterações bioquímicas e funcionais em diferentes níveis celulares, como lipoperoxidação, oxidação de proteínas ou danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), entre outros efeitos tóxicos (MONFARED et al., 2009). Indiretamente, estes radicais

agem na cascata do ácido araquidônico aumentando a produção de tromboxano (TX) e de leucotrieno (LT)-B<sub>4</sub> (RAU et al., 2000). Além disso, alguns dos produtos resultantes da lipoperoxidação podem atuar como cofatores ou ativadores de outros mecanismos patológicos, como a ativação da PLA<sub>2</sub>, uma enzima cujos níveis séricos se correlacionam com a gravidade da pancreatite aguda e que parece estar envolvida na lesão pulmonar que ocorre durante esta doença (TSUKAHARA et al., 1999) ou ainda podem atuar na via de sinalização dos receptores ativados pelo proliferador do peroxissomo gama (PPAR-γ), interferindo na regulação de macrófagos e exacerbando o processo inflamatório durante a pancreatite aguda (GUTIERREZ et al., 2008).

O malondialdeído (MDA) é o principal aldeído liberado pelas membranas das células, resultante dos ataques das ERO a estas membranas, o que leva a lipoperoxidação, um processo que primariamente acomete os ácidos graxos poli-insaturados das biomembranas e se caracteriza por uma degradação auto catalítica mediada por radicais livres (URUÑUELA et al., 2002). Em condições normais, as ERO são geradas por processos celulares aeróbicos e removidas por diferentes sistemas antioxidantes endógenos, mas em algumas situações, como no quadro inflamatório agudo, estas defesas são insuficientes frente a uma produção exacerbada de ERO, desenvolvendo o estresse oxidativo (RAU et al., 2000). A geração destes radicais não é um evento iniciador da pancreatite aguda, no entanto, o aumento das espécies reativas de oxigênio pode ser considerado um importante mediador da lesão tecidual (SEVILLANO et al., 2003).

O NO, um radical livre altamente reativo, tem efeitos biológicos complexos e por vezes paradoxais, atuando ora como um mediador anti-inflamatório, protegendo o endotélio pela inibição da agregação plaquetária e da adesão de leucócitos, ora como um agente citotóxico via geração de peroxinitrito (ANDICAN et al., 2005). Sua função biológica é influenciada pela isoforma de óxido nítrico sintase (NOS) envolvida na sua síntese, pela localização da sua produção e pela quantidade de NO produzido. Constitutivamente no pâncreas, estão presentes as isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS). Durante o processo inflamatório, a isoforma

induzível, iNOS presente nos macrófagos, contribui para a geração de NO (DiMAGNO, 2007). Seu papel na pancreatite ainda é controverso, apresentando efeito protetor, decorrente principalmente da sua ação vasodilatadora na microcirculação (DiMAGNO et al., 2004), enquanto que em outros estudos, apresenta um papel deletério, decorrente principalmente do estresse oxidativo, que contribui para a citotoxicidade de macrófagos e neutrófilos na resposta inflamatória (ANDICAN et al., 2005; MEHTA, 2005).

Uma vez produzidas, as ERO são capazes de desencadear diversos processos inflamatórios (URUÑUELA et al., 2002), seu papel na pancreatite aguda tem sido amplamente estudado em diversos modelos animais (RAU et al., 2000; URUÑUELA et al., 2002; TURKYILMAZ et al., 2008). Acredita-se que a liberação local de ERO e a infiltração de células inflamatórias no pâncreas, principalmente neutrófilos, têm um papel fundamental na evolução da pancreatite aguda e das complicações a ela associadas (CUZZOCREA et al., 2004). Elas podem atacar diretamente a matriz lipídica de membranas biológicas e estimular o metabolismo do ácido araquidônico com o aumento da produção de prostaglandinas (PG), TX e LT, reforçando assim o acúmulo e a aderência de neutrófilos e plaquetas para a parede capilar (YU et al., 2002). Assim, as ERO podem comprometer a microcirculação e perturbar a integridade microvascular, resultando em diminuição da perfusão e aumento da permeabilidade capilar e transudação de fluido (DABROWSKI et al., 1999).

A infiltração de neutrófilos no pâncreas também foi demonstrada como um fator que contribui, através das ERO, para a ativação de enzimas digestivas nas células acinares (SHI et al., 2005). Gutierrez *et al.* (2008) demonstraram o aumento da geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no líquido ascítico e no tecido adiposo branco de ratos, 3 h após a indução da pancreatite aguda por infusão intraductal retrógrada de tauricolato de sódio. No entanto, apesar de serem importantes mediadores da lesão tecidual na pancreatite, as espécies reativas geradas não induzem por si só as alterações enzimáticas e morfológicas típicas da pancreatite, de modo que, outros mediadores devem estar envolvidos no desencadeamento da inflamação pancreática *in vivo* (RAU et al., 2000).

## 2.4 Dor na Pancreatite Aguda

A dor abdominal é um importante sintoma clínico da pancreatite, sendo a primeira e principal reclamação do paciente (CEYHAN et al., 2008). Sua etiologia ainda é controversa, no entanto, acredita-se que a presença de mediadores da inflamação (como neuropeptídios) e fatores neurotrópicos pode estar relacionada à sua patogênese (GRADY et al., 2000; CEYHAN et al., 2008). A dor na pancreatite é geralmente percebida como um grave desconforto epigástrico na região superior do abdômen, que pode irradiar para a região inferior (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2005) e pode estar acompanhada do aumento da sensibilidade da pele ao toque (alodinia) (KAWABATA et al., 2006). Este sintoma pode ter início rápido, com a dor atingindo intensidade máxima em 30 min, frequentemente é caracterizado como “insuportável” e pode persistir por mais de 24 h sem alívio, acompanhado ou não de náusea e vômito (FROSSARD, STEER, PASTOR, 2008; ABELA, CARTER, 2010). O tratamento desta condição na pancreatite é realizado, na prática clínica, com opióides, mas frequentemente resulta em efeitos adversos típicos desta terapia como náuseas, vômito e diminuição da motilidade gastrointestinal (FROSSARD, STEER, PASTOR, 2008). Desta maneira, ainda são necessárias novas abordagens no tratamento da dor nesta patologia.

A etiologia da dor na pancreatite é controversa e pode estar relacionada a fatores mecânicos, como o aumento da pressão ductal no pâncreas e a eventos inflamatórios como a inflamação neurogênica e o estresse oxidativo (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2005; ESCH et al., 2006). O envolvimento de neurônios nociceptivos periféricos e das medulas espinhal e rostroventral foram demonstrados na dor associada com a pancreatite (STEIN et al., 2009). A inervação neural no pâncreas tem um papel importante na indução do edema, na resposta inflamatória e nas respostas vasculares no início e na progressão da pancreatite aguda, pois as fibras sensoriais podem liberar mediadores como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MICHALSKI et al., 2007). A SP é um neuropeptídio presente nas fibras nervosas viscerais aferentes e fibras somáticas não

mielinizadas, nos neurônios sensoriais entéricos e em várias vias do sistema nervoso central (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2004), sendo que a maioria das fibras que inervam o pâncreas expressa este neuropeptídeo, que uma vez liberado nos tecidos periféricos, ativa preferencialmente os receptores de neurocininas (NK)-1 causando extravasamento plasmático (GRADY et al., 2000).

Durante a inflamação, a expressão de receptores NK-1 nos mastócitos sugere que a SP nos tecidos periféricos pode perpetuar a cascata inflamatória, sendo suas ações relacionadas com o aumento da permeabilidade microvascular e extravasamento de proteínas plasmáticas, no entanto, a SP pode causar vasodilatação, em parte, pelo estímulo da liberação de histamina pelos mastócitos (STEIN et al., 2009). A ativação aferente primária também libera o CGRP, um potente vasodilatador, que em concentrações baixas causa vasodilatação por ação direta em receptores específicos, a qual pode ser atenuada por antagonistas seletivos (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2005).

A liberação de SP e CGRP intensificam a resposta inflamatória nos tecidos afetados, pois a SP aumenta a produção e liberação de  $PGE_2$ , enzimas lisossomais, IL-1 e IL-6 (GRADY et al., 2000). Muitos destes mediadores liberados pelos neurônios sensoriais durante a pancreatite podem sensibilizar seus próprios neurônios à ação de substâncias como a bradicinina que ativa os receptores  $B_2$  nos neurônios sensoriais, ativando a fosfolipase C (PLC) que libera os segundos mensageiros 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) (STEIN et al., 2009).

Em contraste com a natureza subjetiva da dor, que é descrita como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 1994) em seres humanos, em animais infere-se sobre os processos nociceptivos através das alterações comportamentais emitidas (MOGIL, CRAGER, 2004), o que pode representar um obstáculo empírico para a sua avaliação. Dentre as pesquisas publicadas envolvendo o estudo da dor, com experimentação animal, cerca de

90% destas incluem medidas comportamentais associadas a lesões inflamatórias ou neuropáticas, que avaliam, exclusivamente, respostas evocadas por estímulos mecânicos ou táteis, como os filamentos de von Frey, e por estímulos térmicos (MOGIL, CRAGER, 2004). Esta subjetividade da experiência dolorosa pode ser um obstáculo à sua avaliação nos modelos animais, assim, nestes casos, o pesquisador infere sobre a experiência do animal, observando suas reações, como no teste da placa quente, *tail-flick* e contorções abdominais, modelos tradicionais de nocicepção aguda em animais (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Outros modelos mais recentes como os de lesão periférica de nervos e de dor neuropática também são usados para o estudo dessas condições clínicas relevantes (HOGAN, 2002).

Um dos parâmetros possíveis de ser avaliado em animais de experimentação é a hiperalgesia, que é a resposta exagerada a um estímulo doloroso, causada pela ativação e sensibilização de nociceptores periféricos que ocorre devido à ação de mediadores químicos produzidos pela lesão ou inflamação tecidual (HOGAN, 2002). A hiperalgesia pode ser primária, quando sentida no local da lesão e pode envolver aumento da sensibilidade ao calor e a estímulos mecânicos, ou secundária, quando ocorrer nas regiões circunvizinhas, envolvendo sensibilização central e sendo caracterizada por um aumento da resposta a estímulos mecânicos (TREEDE, MARGERL, 2000; SERPELL, 2006). A nocicepção visceral é um importante aspecto da dor em humanos, e, em geral, modelos de dor visceral em roedores envolvem injeção intraperitoneal de algum agente irritante que deve induzir contorções abdominais (HOGAN, 2002). A escassez de estudos experimentais de dor visceral deve-se, em parte, à dificuldade de acesso aos órgãos viscerais, quando comparado com a estrutura superficial da pele (LAIRD et al., 2001).

Nos modelos animais de pancreatite a dor visceral é caracterizada por uma diminuição do limiar de resposta a estímulos mecânicos em áreas abdominais (VERA-PORTOCARRERO, LU, WESTLUND, 2003). Com este fim, os filamentos de von Frey foram utilizados por KAWABATA *et al.* (2006) e por ISHIKURA *et al.* (2007) na pancreatite induzida pela ceruleína em camundongos, bem como o von Frey eletrônico foi usado na pancreatite

induzida por PLA<sub>2</sub> secretória (CAMARGO et al., 2011). Entretanto, não há descrição da avaliação do limiar hipernociceptivo no modelo de pancreatite induzida por ODBP, um modelo que mimetiza a pancreatite induzida por litíase.

Desta forma, a dor, principalmente como consequência da inflamação local, é uma característica marcante da pancreatite, que necessita de novas terapias. O tratamento atual inclui o uso de analgésicos opióides, que acarretam uma série de efeitos indesejados aos pacientes (PANDOL et al., 2007). Estas substâncias, assim como muitas outras usadas atualmente na prática clínica, tiveram sua descoberta e desenvolvimento a partir de plantas utilizadas popularmente (HARVEY, 2008), e ainda hoje os produtos naturais possuem potencial para o desenvolvimento de novas terapias.

## **2.5 Produtos Naturais**

O conhecimento de diversos grupos étnicos a respeito dos produtos naturais tem desempenhado historicamente um papel vital na descoberta de novos compostos bioativos derivados de plantas (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS; 1999), nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para os cuidados básicos com a saúde. No Brasil, a inserção da fitoterapia no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) foi estimulada a partir da aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006a) e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2006b), que buscam valorizar o conhecimento construído pelas populações locais a respeito dos seus recursos naturais e do seu uso na saúde e nas doenças, bem como inserir o uso das plantas medicinais e dos fitoterápicos na atenção básica no sistema público.

Neste contexto, destaca-se o ecossistema da caatinga, que se estende por cerca de 734.480 km<sup>2</sup> incluindo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio

Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA, ALBUQUERQUE, 2005) e se caracteriza pela presença de vegetação xerófila, chuvas irregulares com longos períodos de estiagem, altas temperaturas e elevado grau de radiação ultravioleta (DESMARCHELIER et al., 1999). Agra et al. (2008), em uma investigação etnobotânica acerca das plantas medicinais em uso no nordeste do Brasil, mostraram que 126 espécies foram citadas como medicinais, correspondendo a 20% do total de plantas nativas, das quais 6 pertenciam ao gênero *Caesalpinia*.

As espécies pertencentes a este gênero estão amplamente distribuídas nas áreas tropicais e subtropicais no mundo (BAHIA et al., 2005). A *Caesalpinia minax* é utilizada na medicina tradicional para tratar a gripe, em disenterias e na inflamação decorrente do reumatismo (CHENG et al., 2009); a *C. cheilanta*, para tratar dores de cabeça e como expectorante; a *C. ferrea* contra doenças renais e labirintite (ALBUQUERQUE, 2007) e a *C. echinata*, *C. microphylla* e *C. pulcherrima*, no tratamento de problemas no trato gastrointestinal (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007). A análise fitoquímica da *C. bonducella* indicou a presença de flavonóides, terpenos, glicosídeos, saponinas, taninos e alcalóides, e testes farmacológicos demonstraram a presença de atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante nesta espécie (ARCHANA et al., 2005).

A espécie *C. pyramidalis* Tul. (Fig. 1) pertencente ao gênero *Caesalpinia*, família Fabaceae, é uma árvore endêmica da região nordeste na vegetação da caatinga, no sertão, habitando lugares pedregosos, e é conhecida popularmente como “catingueira”, “catingueira-das-folhas-largas”, “catinga de porco”, “pau-de-rato” e “massitaiba” (SILVA, MATOS, 1998). Na medicina popular sua entrecasca é utilizada como anti-inflamatória, diurética, dispéptica, digestiva, antipirética, afrodisíaca e expectorante sob a forma de decocto ou “garrafada” (SILVA, MATOS, 1998; MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005; AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007). Da fração clorofórmica das folhas de *C. pyramidalis* foram isolados flavonóides e outros compostos fenólicos como o ácido 4- $\alpha$ -D-glicopiranosiloxi(Z)-7-hidroxicinâmico e ácido 4- $\alpha$ -D-glicopiranosiloxi(Z)-8-hidroxicinâmico (MENDES et al., 2000), galato de

metila, canferol, apigenina, siringaresinol, estigmasterol,  $\beta$ -sistosterol, lupeol (BAHIA et al., 2005), agastiflavona, taxifolina, ioniflavona, amentoflavona, 5'-hidroxiaumentoflavona e podocarpusflavona (BAHIA et al., 2010).



**Figura 2: Hábito de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae).** Fonte: CINP, 2011.

No estudo de Santos *et al.* (2011), o extrato etanólico de *C. pyramidalis* apresentou atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que é um teste inespecífico para avaliar a presença de dor visceral, no teste da formalina, que investiga a atividade central e periférica, e no teste da placa quente, que é útil quando se deseja avaliar a ação de substâncias que atuam modulando a resposta dolorosa em nível espinhal e supra espinhal. Este extrato também apresentou propriedades anti-inflamatórias ao reduzir a infiltração de leucócitos para a cavidade abdominal no modelo de peritonite induzida por carragenina, bem como diminuiu a migração de leucócitos para a pata no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Um estudo recente de Silva *et al.*, (2011) avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas e da entrecasca de *Caesalpineia pyramidalis* no qual foi observado um alto conteúdo de flavonóides totais e uma elevada capacidade de quelação do ferro.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do extrato etanólico de *Caesalpinia pyramidalis* (EECP) no tratamento da pancreatite aguda induzida por obstrução do ducto biliopancreático em roedores.

### 3.2 Objetivos Específicos

Realizar análise cromatográfica do EECP;

Investigar o efeito do EECP no quadro inflamatório pancreático e pulmonar induzido pela ODBP;

Comparar os níveis de enzimas pancreáticas em animais tratados ou não com o EECP;

Avaliar a atividade antioxidante do EECP no modelo de pancreatite aguda induzida por ODBP;

Avaliar a atividade antinociceptiva do EECP no modelo de pancreatite aguda induzida por ODBP.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e Drogas

Os principais reagentes e drogas utilizados para a realização deste estudo foram Apigenina, Rutina, Quercetina, Baicaleína, *Aspergillus* Nitrato Redutase, Brometo de hexadeciltrimetilamônio, Dihidrocloreto de *o*-dianisidina, Flavina Adenosina Dinucleotídeo, Lactato Desidrogenase, Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina, Piruvato (obtidos da Sigma<sup>®</sup> Chemical, EUA), Diazepam, Isoflurano e Sulfato de Morfina (obtido da Cristália<sup>®</sup>, Itapira, SP): Os demais reagentes foram adquiridos da Synth, São Paulo, SP.

### 4.2 Coleta e Identificação da Planta

A entrecasca do tronco da planta *Caesalpinia pyramidalis* foi coletada no povoado Xingó, município de Canindé do São Francisco, estado de Sergipe (09°66'00" S, 37°78'94" O), em setembro de 2008. Um espécime foi identificado pela botânica Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Prata, do Departamento de Biologia da UFS, e depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão – SE, 49100-000, Brasil) sob o n° ASE 13.164. Antes da extração, a entrecasca foi seca em estufa (MA035/5, Marconi<sup>®</sup>, Piracicaba, SP) a 40°C, com renovação e circulação de ar, por 48 h.

### 4.3 Preparação do Extrato Etanólico

A entrecasca seca (2.840 g) da *C. pyramidalis* foi inicialmente pulverizada em moinho de facas (MA680, Marconi<sup>®</sup>, Piracicaba-SP) e,

posteriormente, submetida à extração com etanol 90% em percolador de aço inoxidável (PE, Erli Máquinas, São Paulo-SP) durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo (MA120, Marconi®, Piracicaba-SP) com pressão reduzida a 45°C, com um rendimento de 2,62%, obteve-se o extrato etanólico bruto da entrecasca (EECp), que foi seco e submetido aos ensaios para determinar o perfil cromatográfico e avaliar a atividade farmacológica.

#### 4.4 Análise Cromatográfica do EECp

Para a análise através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta (UV), o EECp e os padrões dos flavonóides (rutina, apigenina, quercetina e baicaleína) foram dissolvidos em metanol resultando em concentrações de 5 e 0,1 mg/mL, respectivamente. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as soluções foram filtradas através de uma membrana filtrante de celulose regenerada com 0,45 µm de diâmetro do poro.

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU® (Kyoto, Japão), modelo Prominence, para eluição gradiente, composto pelos seguintes módulos: duas bombas (LC-6A), degaseificador (DGU-20A<sub>3</sub>), auto injetor (SIL-10A) e detector de UV com arranjos de diodo (SPD-M20Avp), ambos conectado a uma interface (CBM 20A). O equipamento foi gerenciado pelo *software* LC *solution*. Nas análises cromatográficas foi empregada a coluna analítica Phenomenex LUNA® 5 µm C18 (250 x 4,6 mm). A separação dos compostos se deu por meio da eluição gradiente no modo reverso, com fase móvel constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A) e acetonitrila (ACN) (B) na proporção 30-63,3% de B por 30 min. Ao término da corrida, empregou-se um gradiente para limpeza da coluna de 40-100% de B por 5 min e 100% de B por 5 min, em seguida foi realizado o retorno para a condição inicial do método com tempo de espera para o condicionamento da coluna de 10 min. Utilizou-se fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20

μL. Os cromatogramas foram monitorados pelo Diode Array Detection DAD (254 nm).

## **4.5 Animais**

Neste estudo foram utilizados 104 ratos machos Wistar (220-270 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe, que foram acondicionados em caixas apropriadas e mantidos a  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  com livre acesso a água e comida em um ciclo claro-escuro de 12 h. Os animais foram privados do acesso à ração por 8 h antes do experimento, mas com livre acesso a água. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (CEPA/UFS) sob o protocolo nº 28/11. Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de isoflurano (Isoforine, Cristália<sup>®</sup>, Itapira-SP) inalatório seguida de exsanguinação e suas carcaças acondicionadas em sacos plásticos e guardadas em freezer reservado para este fim, até o descarte definitivo conforme rotina do Departamento de Fisiologia, pelo serviço de coleta seletiva de lixo biológico da UFS.

## **4.6 Procedimento Experimental de Indução da Pancreatite por ODBP**

Os animais foram anestesiados com 2-3% de isoflurano pela via inalatória e submetidos à indução da pancreatite aguda por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) como previamente descrito por Samuel *et al.* (1994). Este procedimento consiste em uma laparotomia mediana através da qual o pâncreas foi exteriorizado pela porção duodenal, permitindo a realização da ligadura do ducto biliopancreático na região próxima ao duodeno. Para tanto, duas linhas foram inseridas contornando o ducto biliopancreático, que foi

suturado em duas posições com uma distância de, pelo menos, 0,5 cm entre elas. Entre estas posições, foi realizado um pequeno corte, de maneira a garantir a obstrução do fluxo no ducto biliopancreático. Concomitantemente, grupos de animais foram submetidos à anestesia, laparotomia e exteriorização do pâncreas, sem a obstrução do ducto biliopancreático como controle experimental (*sham* ou “falso operado”). Os animais foram eutanasiados 6 ou 24 h após a obstrução do ducto, dependendo do protocolo experimental.

#### 4.7 Delineamento Experimental

Os ratos foram divididos em 10 grupos experimentais com 6-8 animais por grupo, sendo 5 grupos no protocolo 1 (eutanásia 6 h após a indução da pancreatite) e 5 grupos no protocolo 2 (eutanásia 24 h após a indução da pancreatite), a saber:

Protocolo 1 (Figura 2):

- i. Grupo veículo + *sham*: os animais foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em NaCl a 0,9%; 10 mL/kg; 1 h antes, v.o.), submetidos à laparotomia e eutanasiados 6 h após a cirurgia;
- ii. Grupo veículo + ODBP: os animais foram pré-tratados com veículo (1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP e eutanasiados 6 h após a cirurgia;
- iii. Grupo EECp (100 mg/kg) + ODBP: os animais foram pré-tratados com EECp na dose de 100 mg/kg (1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP e eutanasiados 6 h após a cirurgia;
- iv. Grupo EECp (200 mg/kg) + ODBP: os animais foram pré-tratados com EECp na dose de 200 mg/kg (1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP e eutanasiados 6 h após a cirurgia;
- v. Grupo EECp (400 mg/kg) + ODBP: os animais foram pré-tratados com EECp na dose de 400 mg/kg (1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP e eutanasiados 6 h após a cirurgia.



**Figura 2. Linha do tempo referente ao protocolo 1 de tratamento da pancreatite induzida por ODBP.**

Protocolo 2 (Figura 3):

i. Grupo veículo + *sham*: os animais foram pré-tratados com veículo (1 h antes, v.o.), submetidos à laparotomia, novamente tratados com veículo (12 h após, v.o.) e eutanasiados 24 h após a cirurgia;

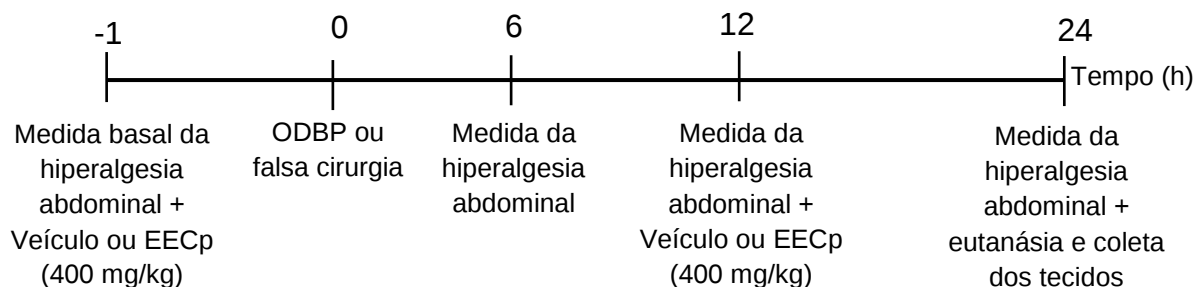
ii. Grupo veículo + ODBP: os animais foram pré-tratados com veículo (1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP, novamente tratados com veículo (12 h após, v.o.) e eutanasiados 24 h após a cirurgia;

iii. Grupo EECp 1D + ODBP: os animais foram pré-tratados com EECp (400 mg/kg; 1 h antes, v.o.) submetidos à indução da pancreatite por ODBP, novamente tratados com veículo (12 h após, v.o.) e eutanasiados 24 h após a cirurgia;

iv. Grupo EECp 2D + ODBP: os animais foram pré-tratados com EECp (400 mg/kg, 1 h antes, v.o.), submetidos à indução da pancreatite por ODBP, novamente tratados com EECp (400 mg/kg, 12 h após, v.o.) e eutanasiados 24 h após a cirurgia.

v. Grupo Morfina 5 mg/kg + ODBP: os animais foram submetidos à medida basal da hiperalgesia abdominal, seguida da indução da pancreatite por ODBP e tratados com sulfato de morfina (5 mg/kg; i.p.) 30 min antes de cada realização das medidas de hiperalgesia abdominal que ocorreram 6, 12 e 24 h depois da indução da pancreatite (VERA-PORTOCARRERO, LU, WESTLUND, 2003). Este grupo foi usado apenas como controle no teste da hiperalgesia

abdominal e os seus parâmetros bioquímicos e inflamatórios não foram avaliados.



**Figura 3. Linha do tempo referente ao protocolo 2 de tratamento da pancreatite induzida por ODBP.** O grupo de animais tratados com morfina não é mostrado nesta linha.

Após os tempos experimentais determinados, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório para a coleta de amostras (20 µL) de sangue periférico da ponta da cauda para contagem de leucócitos e da veia abdominal (5 mL) para posterior separação do soro. Sequencialmente os animais foram eutanasiados por exsanguinação e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de salina (0,9%) com heparina (5 UI/L), para a coleta de amostras de pulmão, pâncreas, fígado e rim, que foram devidamente armazenadas em freezer a -20°C. Após coletado, o sangue foi centrifugado a 2500 g por 15 min a 4°C, para a separação do soro que foi estocado a -20°C.

#### 4.8 Medida da Hiperalgesia Abdominal

Para a realização deste teste, utilizou-se o modelo eletrônico de von Frey, (EFF31, Insight®, Ribeirão Preto-SP, VIVANCOS et al., 2004). Os animais foram transferidos para gaiolas individuais e ambientados por 3 dias seguidos (1 vez ao dia por 30 min). No dia do teste, foram aplicados estímulos mecânicos no abdômen, em triplicata, nos diferentes grupos experimentais,

antes e após a indução da pancreatite. Para cada animal e em cada um dos tempos de avaliação após a obstrução do ducto (6-24 h), registrou-se o limiar da resposta de retirada do abdômen (em g) resultante da média de três medidas consecutivas com intervalos de pelo menos 1 min entre elas (CAMARGO et al., 2011). No protocolo 1, as medidas foram feitas 1 h antes e 6 h depois da indução da pancreatite aguda; para o protocolo 2, as medidas foram realizadas 1 h antes, 6, 12 e 24 h após a indução da pancreatite.

O teste foi realizado de maneira encoberta, de modo que o experimentador que realizou as medidas não tinha conhecimento sobre os grupos experimentais. Os valores foram expressos como a diferença entre os valores de intensidade do estímulo inicial e final ( $\Delta$ ; em g).

#### **4.9 Determinação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) em Pâncreas e Pulmão**

A medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato *o*-dianisidina na presença de  $H_2O_2$ , evidenciada pela mudança de absorbância medida a 460 nm. Amostras de pâncreas e pulmão dos animais foram coletadas, pesadas e cortadas em pedaços pequenos e mantidas em tubos teste na presença de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio). Cada amostra foi homogeneizada em homogeneizador de tecidos Ultra Turrax durante 15 s, e alíquotas do homogenato foram centrifugadas (2 min, 8000 g, 4°C). Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO, conforme descrito a seguir. Em uma placa de 96 poços, alíquotas de sobrenadante foram adicionadas a solução de dihidrocloreto de *o*-dianisidina (0,167 mg/mL, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,005% de  $H_2O_2$ ). As alterações nos valores da absorbância (460 nm) foram registradas em leitor de microplaca (Labsystem Multiskan®, Helsinki, Finlândia), a intervalos de 15 s durante 2-10 min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO por mg de tecido (UMPO/mg de tecido). Uma UMPO foi considerada como a

quantidade de enzima que degrada 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido/min (BRADLEY et al., 1982; CAMARGO et al., 2005).

#### **4.10 Determinação do Conteúdo Tecidual de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em Pâncreas, Pulmão, Fígado e Rim**

A determinação dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) envolve a quantificação dos aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, resultantes da degradação de hidroperóxidos, incluindo o MDA (BOSE, SUTHERLAND, PINSKY, 1989).

Amostras de pâncreas, pulmão, fígado e rim foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mM). A seguir, alíquotas do homogenato (em duplicata) foram incubadas a 90°C durante 45 min com solução contendo TBA a 0,37%, em meio ácido (ácido tricloroacético (TCA) a 15% e ácido clorídrico 0,25 N). No final da incubação, e após centrifugação durante 5 min a 8000 g, alíquotas dos sobrenadantes foram submetidas à extração do produto de reação com igual volume de n-butanol e solução saturada de NaCl, seguida pela agitação em vórtex por 30 s e centrifugação durante 2 min a 8000 g. Alíquotas dos sobrenadantes (fase orgânica) foram pipetadas em placa de 96 poços para leitura dos valores de absorbância em leitor de microplaca a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorbância a 572 nm). Os resultados foram expressos como nmol de MDA por mg de tecido (BOSE, SUTHERLAND, PINSKY, 1989), utilizando-se, para o cálculo, um coeficiente de extinção molar de  $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.11 Determinação de Metabólitos do NO ( $\text{NO}_x$ )**

A técnica se baseia na detecção de nitrato e nitrito, metabólitos do NO, após a redução do nitrato a nitrito, que será determinado pela reação de

Griess, segundo método modificado de Grisham *et al.*, (1996). Amostras de soro foram centrifugadas em microtubos de 10 kDa (Microcon, Ultracel YM-10, Millipore, USA) a 8000 *g* durante 120 min. Em seguida, 100  $\mu$ L do sobrenadante foram incubados durante 30 min a 37°C em estufa na presença de *Aspergillus* nitrato redutase, flavina adenosídeo dinucleotídeo (FAD) e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), preparadas em tampão Tris-HCl pH 7,6, decorrido este tempo, foram acrescentados lactato desidrogenase e ácido pirúvico com incubação adicional de 30 min a 37°C. Ao final do período de incubação 100  $\mu$ L do reagente de Griess (iguais volumes de 0,2% (v/v) naftilenoetilenodiamina e 2% (v/v) sulfanilamida em 5% (v/v) de ácido fosfórico) foram adicionados, e após 10 min em temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 540 nm em leitor de microplaca. A curva-padrão de NaNO<sub>3</sub> nas concentrações 0,2-200  $\mu$ mol/L foi realizada e os resultados foram expressos como  $\mu$ mol de NO<sub>x</sub><sup>-</sup> por litro de soro.

#### 4.12 Determinação de Amilase e Lipase Séricas

A concentração de amilase e lipase no soro foram avaliadas para cada grupo experimental utilizando-se kits comerciais para a dosagem dessas enzimas (kit cinético para determinação de amilase [KATAL Biotecnológica® Ind. e Com. Ltda] e kit colorimétrico para determinação de lipase [Human do Brasil®]), conforme orientação dos fabricantes.

#### 4.13 Medida do Índice de Edema Pancreático

O índice de edema foi calculado pela razão entre o peso úmido e peso seco das amostras de tecido pancreático. Para isso, as amostras foram submetidas à secagem em estufa à temperatura de 90°C, por 12 h, e a massa dos tecidos, mensurada antes e após a secagem.

#### **4.14 Determinação da Contagem Total e Diferencial de Leucócitos**

A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em esfregaço sob lâmina obtido em citocentrífuga de bancada (Sorocito 2400, FANEN<sup>®</sup>, São Paulo-SP), a 500 g por 10 min, corados com corante panótico InstantProv<sup>®</sup> e analisadas sob microscópio ótico (CX41, Olympus Optical do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo-SP). Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se as células polimorfonucleares das mononucleares, baseando-se no critério morfológico normal. Os resultados foram expressos como número de leucócitos/mL de sangue.

#### **4.15 Estudo da Atividade Locomotora (teste do campo aberto)**

A atividade locomotora dos animais foi investigada no campo aberto (Insight<sup>®</sup>, Ribeirão Preto-SP) de 60 cm de diâmetro. Os ratos foram divididos em três grupos experimentais contendo 6 animais cada e tratados com veículo ou EECp (400 mg/kg; v.o.) 1 h antes e diazepam (Compaz - Cristália<sup>®</sup>, Itapira-SP; 1,5 mg/kg; i.p.) 30 min antes de serem colocados individualmente ao campo aberto, e após 1 minuto de ambientação, foi registrada durante 4 min a frequência de locomoção dos animais, que consistiu do ato do animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões da arena do campo aberto, e foi expressa como número de campos cruzados, segundo descrição de Capaz *et al.*, (1981). Após 6 h da primeira entrada no campo, os animais foram recolocados individualmente no campo aberto e a frequência de locomoção foi novamente mensurada.

#### **4.16 Análise Estatística**

Os resultados experimentais foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente utilizando-se a análise de

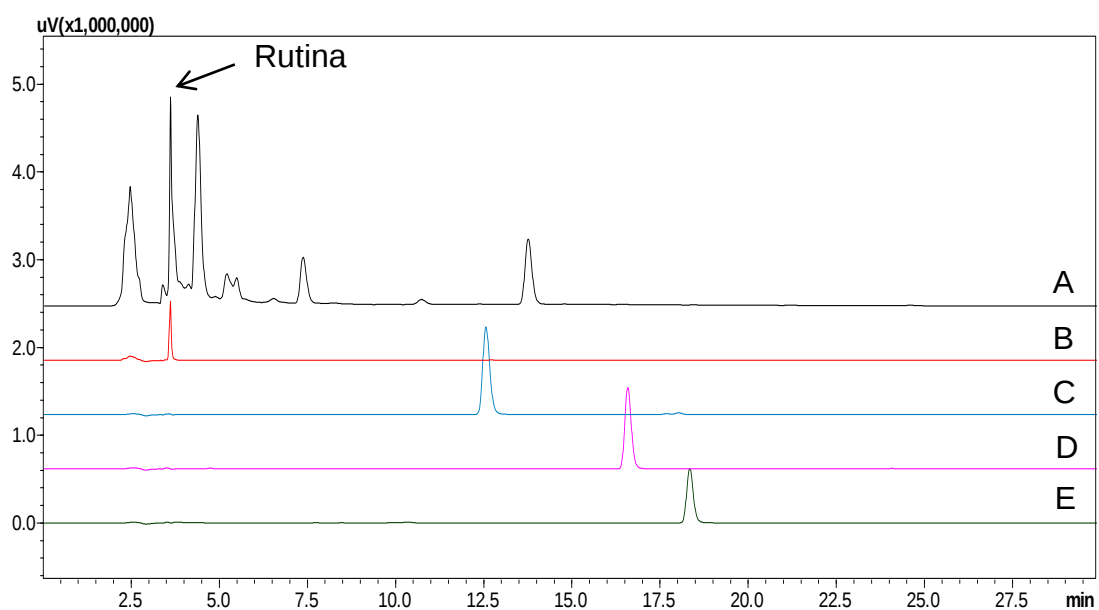
variância (ANOVA) de 1 ou 2 vias, quando conveniente, e o pós-teste de Tukey, através do programa GraphPad Prism (versão 5.0). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Nos resultados de hiperalgesia foi utilizada a ANOVA de duas vias para comparar os grupos e os tratamentos em todos os tempos. Os fatores analisados foram tratamento, tempo e a interação entre ambos. Quando uma interação foi detectada, a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey foi realizada para cada tempo experimental a fim de distinguir o efeito dos diferentes tratamentos.

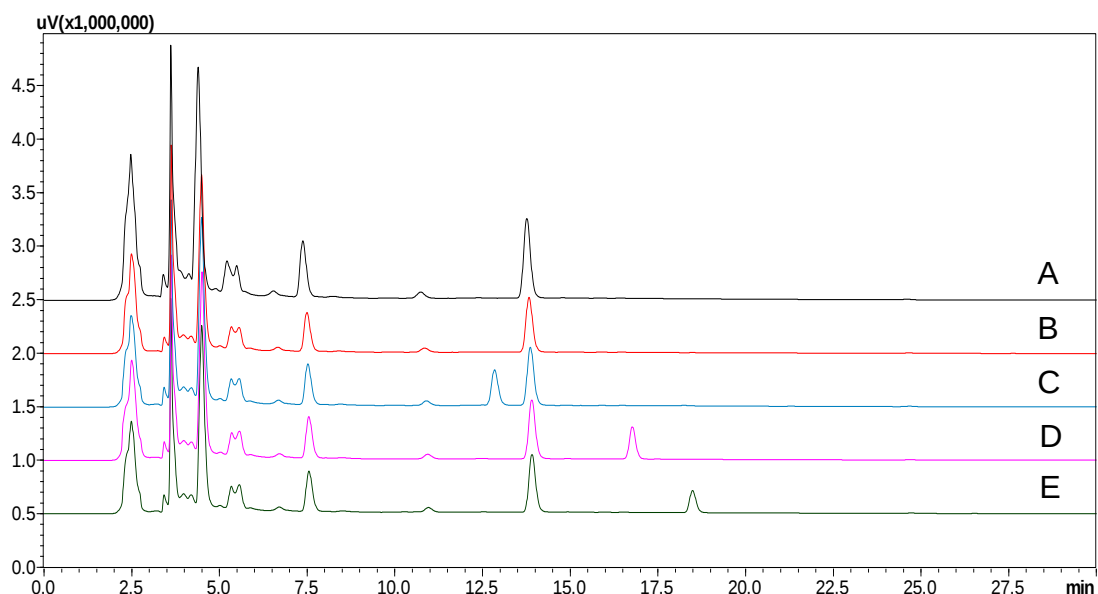
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Cromatográfica do EECp

As figuras 4 e 5 mostram os cromatogramas representativos das soluções padrões e do EECp, respectivamente sem e com fortificação com os flavonóides apigenina, baicaleína, quercetina e rutina. O EECp apresenta pelo menos 5 picos importantes e o tempo de retenção da rutina foi o único a estar de acordo com um dos picos presentes no EECp.



**Figura 4.** Cromatogramas representativos (254 nm) do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp; A) e dos padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleína (E).



**Figura 5.** Cromatogramas representativos (254 nm) do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp; A) fortificado com os padrões rutina (B), quercetina (C), apigenina (D) e baicaleína (E).

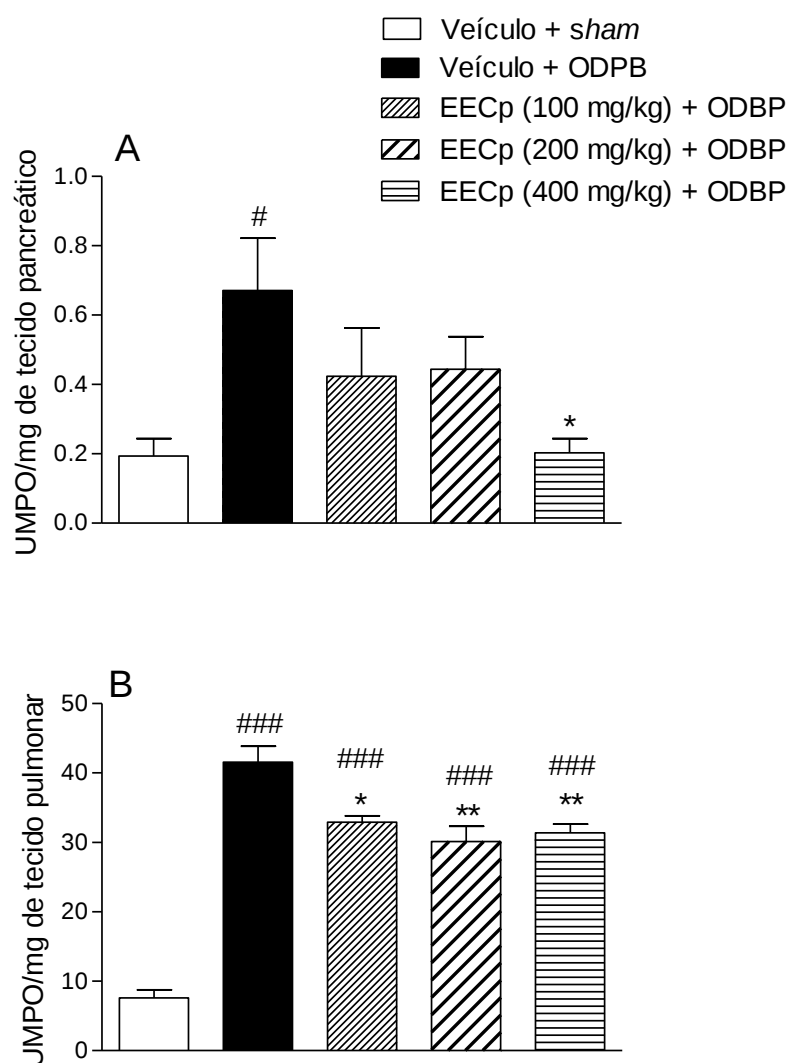
## 5.2 Efeito do EECp Sobre os Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios Avaliados 6 h Após a Indução da Pancreatite por ODBP

### 5.2.1 Atividade de MPO, Índice de Edema e Contagem Total e Diferencial dos Leucócitos

Após 6 h da indução da pancreatite por ODBP, foi observado um aumento ( $P < 0,05$ ) da atividade da MPO pancreática, em comparação com os animais *sham*, conforme demonstrado na figura 6A. O tratamento com 400 mg/kg do EECp reduziu ( $P < 0,05$  vs veículo + OBDP) a atividade de MPO mensurada neste tecido, de modo que não foi observada diferença entre a atividade de MPO pancreática neste grupo, quando comparado com o grupo veículo + *sham*.

No pulmão dos animais com pancreatite induzida por ODBP e tratados com veículo, observou-se um aumento ( $P < 0,05$ ) da atividade de MPO em comparação com os animais do grupo *sham*. Este efeito foi reduzido

parcialmente nos grupos de animais com pancreatite induzida por ODBP e que receberam administração prévia do EECp nas doses de 100 ( $P<0,05$ ), 200 ou 400 mg/kg ( $P<0,01$ ; Figura 6B), no entanto, quando a atividade da MPO pulmonar nestes grupos foi comparada com o grupo veículo + *sham*, observou-se diferença entre as mesmas ( $P<0,001$ ).



**Figura 6. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na atividade de mieloperoxidase (MPO) em pâncreas (A) ou pulmão (B).** Os animais foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 ou 400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). A atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido pancreático (A) ou pulmonar (B) é mostrada com média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos; # $P<0,05$  ou ### $P<0,001$  vs veículo + *sham*, \* $P<0,05$  ou \*\* $P<0,01$  vs veículo + ODBP (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

Após 6 h da indução da pancreatite por ODBP, não foi observado aumento significativo do índice de edema pancreático ( $4,6 \pm 0,3$ ) nos animais com pancreatite por ODBP tratados apenas com veículo, em relação aos animais *sham* ( $3,7 \pm 0,3$ ), embora exista uma tendência a maiores valores no grupo em que foi induzida a pancreatite. Estes valores não foram alterados pelo tratamento com o EECp ( $3,8 \pm 0,3$ ;  $3,9 \pm 0,4$  e  $4,6 \pm 0,1$  para as doses de 100, 200 ou 400 mg/kg respectivamente).

O número total de leucócitos no sangue periférico, bem como o número de polimorfonucleares e mononucleares foi aumentado ( $P < 0,001$ ) pela indução da pancreatite por ODBP, quando comparado ao grupo de animais *sham*. O tratamento com o EECp, em todas as doses utilizadas, reduziu estes efeitos ( $P < 0,001$ ; Tabela 1), ao passo em que não houve diferença entre as contagens de leucócitos totais e diferenciais entre os grupos de animais com pancreatite por ODBP tratados com EECp e os animais *sham*.

**Tabela 1. Contagem leucocitária total e diferencial no sangue periférico de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).**

| Grupos                  | Leucócitos Totais<br>( $\times 10^6$ /mL) | Polimorfonucleares<br>( $\times 10^6$ /mL) | Mononucleares<br>( $\times 10^6$ /mL) |
|-------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|
| Veículo + <i>sham</i>   | $1,3 \pm 0,5$                             | $0,7 \pm 0,3$                              | $0,6 \pm 0,2$                         |
| Veículo + ODBP          | $6,8 \pm 0,1^{####}$                      | $4,9 \pm 0,3^{####}$                       | $1,9 \pm 0,3^{####}$                  |
| EECp (100 mg/kg) + ODBP | $2,3 \pm 0,1^{***}$                       | $0,5 \pm 0,1^{***}$                        | $0,8 \pm 0,1^{***}$                   |
| EECp (200 mg/kg) + ODBP | $2,5 \pm 0,1^{***}$                       | $1,6 \pm 0,1^{***}$                        | $0,9 \pm 0,1^{***}$                   |
| EECp (400 mg/kg) + ODBP | $2,6 \pm 0,2^{***}$                       | $1,7 \pm 0,3^{***}$                        | $0,9 \pm 0,2^{***}$                   |

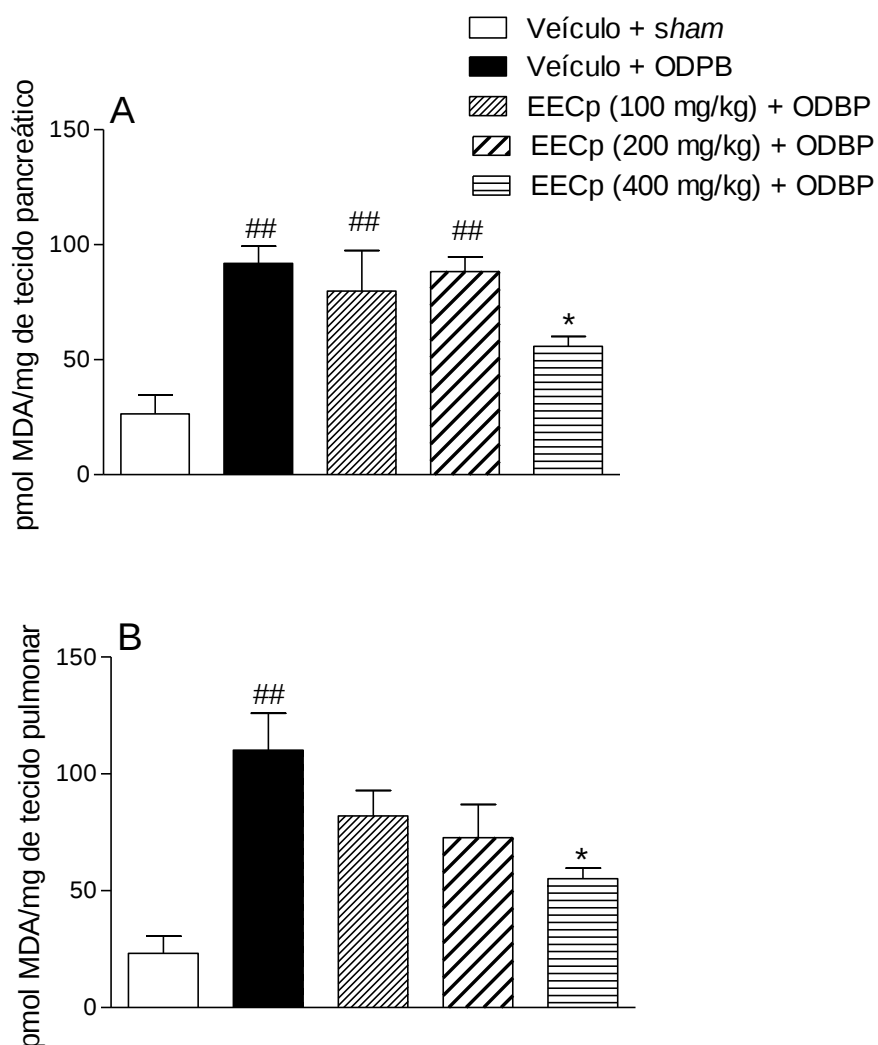
Os animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 ou 400 mg/kg), 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Os valores representam média  $\pm$  EPM para  $n=6-8$ ; ANOVA seguido do pós-teste de Tukey,  $^{####}P < 0,001$  vs veículo + *sham*;  $^{***}P < 0,001$  vs veículo + ODBP.

### 5.3.2 Determinação de TBARS e de $\text{NO}_x^-$

No pâncreas e no pulmão dos animais com ODBP, observou-se um aumento ( $P < 0,01$  vs grupo veículo + *sham*) da peroxidação lipídica, medida através da quantidade de MDA formado pela reação com o ácido tiobarbitúrico. O EECp na dose de 400 mg/kg diminuiu ( $P < 0,05$ ) as concentrações de MDA nos tecidos pancreático e pulmonar em relação aos animais com pancreatite aguda induzida por ODBP e pré-tratados com veículo (Figuras 7A e 7B, respectivamente), para valores que não diferiram do grupo veículo + *sham*. Os animais com pancreatite e pré-tratados com 100 ou 200 mg/kg de EECp não apresentaram alteração significativa da peroxidação lipídica no pâncreas e pulmão, quando comparados ao grupo veículo + ODBP.

Na tentativa de investigar a presença de lesão tecidual por estresse oxidativo causada pelo EECp, foi realizada a medida de formação de MDA no fígado e rim. Desta forma, a indução ODBP não alterou a formação de MDA no fígado ou rim dos animais, quando comparado ao respectivo grupo veículo + *sham*. Por sua vez, a administração de 400 mg/kg de EECp não alterou a concentração de MDA no fígado quando comparado com o grupo veículo + *sham* ou com o grupo veículo + ODBP (Tabela 2). O mesmo ocorreu em relação à concentração de MDA no rim dos animais que receberam a dose de EECp de 400 mg/kg. (Tabela 2).

A indução da pancreatite por ODBP aumentou a concentração de  $\text{NO}_x^-$  no soro dos animais tratados com o veículo em relação aos animais veículo + *sham* ( $P < 0,01$ ). Este aumento não ocorreu nos grupos de animais com pancreatite que foram tratados com 400 mg/kg de EECp, cujas concentrações de  $\text{NO}_x^-$  apresentaram-se diferentes ( $P < 0,05$ ) dos valores do grupo veículo + ODBP, além de não terem apresentado diferença em relação aos animais do grupo veículo + *sham* (Figura 8).

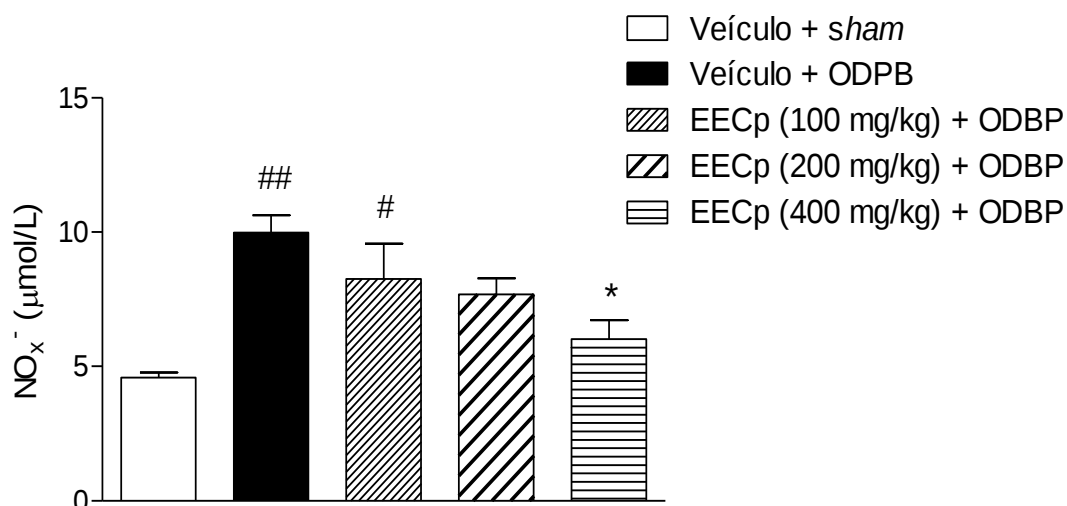


**Figura 7. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração de malondialdeído (MDA) em pâncreas (A) ou pulmão (B).** Os animais foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 ou 400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). A concentração de MDA no tecido pancreático (A) ou pulmonar (B) é mostrada com média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos; <sup>##</sup> $P < 0,01$  vs veículo + *sham*, <sup>\*</sup> $P < 0,05$  vs veículo + ODBP (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

**Tabela 2. Concentração de MDA em fígado e rim de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).**

| Grupos                  | Fígado                  | Rim                     |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                         | (pmol MDA/mg de tecido) | (pmol MDA/mg de tecido) |
| Veículo + <i>sham</i>   | 7 ± 1                   | 41 ± 11                 |
| Veículo + ODBP          | 10 ± 2                  | 59 ± 17                 |
| EECp (400 mg/kg) + ODBP | 10 ± 1                  | 48 ± 13                 |

Os animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg), 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Os valores representam média ± EPM para n=6-8; ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

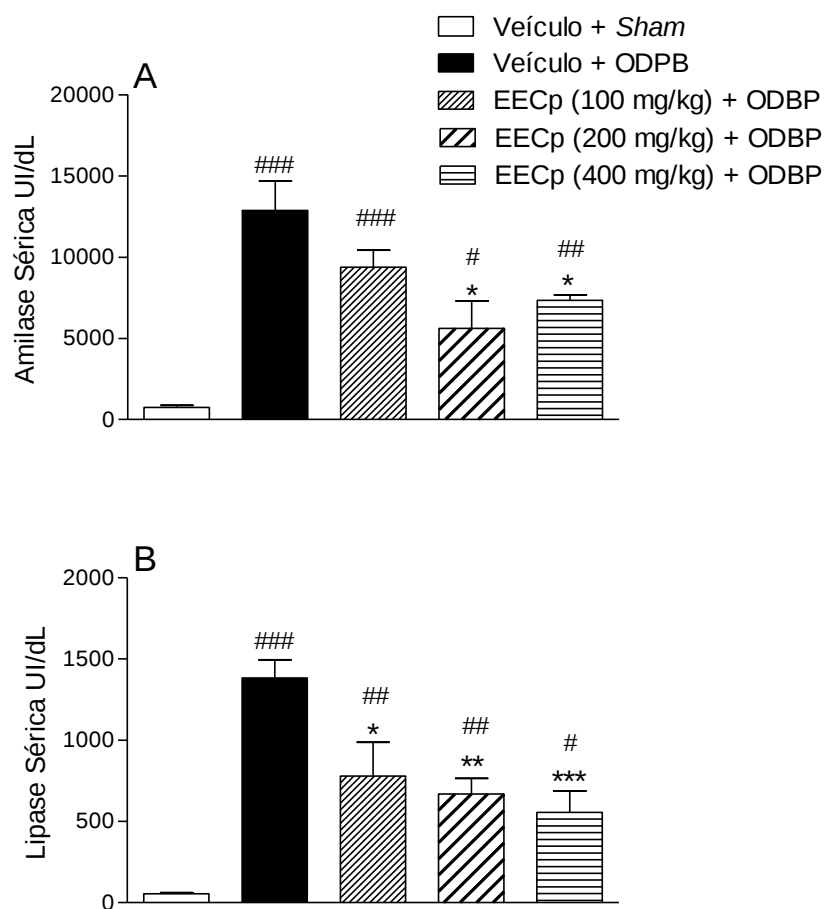


**Figura 8. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) no soro.** Os animais foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 ou 400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). A concentração de NO<sub>x</sub><sup>-</sup> no soro é mostrada com média ± EPM de 6-8 ratos; #P<0,01 ou ##P<0,01 vs veículo + *sham*, \*P<0,05 vs veículo + ODBP (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

### 5.2.2 Níveis de Amilase e Lipase Séricas

Os níveis de amilase e lipase séricas também aumentaram substancialmente (P<0,001) devido à indução da pancreatite. Em relação aos níveis de amilase, foram encontradas reduções nos grupos de animais que

receberam previamente as doses de 200 ou 400 mg/kg de EECp ( $P < 0,05$ ; Figura 9A). A figura 9B mostra a diminuição da atividade da lipase sérica nos grupos de animais que receberam as doses de 100 ( $P < 0,05$ ), 200 ( $P < 0,01$ ) ou 400 mg/kg ( $P < 0,001$ ) do EECp, em relação ao grupo com pancreatite induzida por ODBP e pré-tratados com o veículo ( $P < 0,001$ ). A redução nos níveis séricos destas enzimas foi parcial, havendo diferença significativa em relação aos animais do grupo veículo + *sham* para todos os tratamentos realizados (Figura 9).



**Figura 9. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 6 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de amilase (A) ou lipase (B) séricas.** Grupos de ratos foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 ou 400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). As concentrações de amilase (A) ou lipase (B) séricas são mostradas com média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos; # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  ou ### $P < 0,001$  vs veículo + *sham*, \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  ou \*\*\* $P < 0,001$  vs veículo + ODBP (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

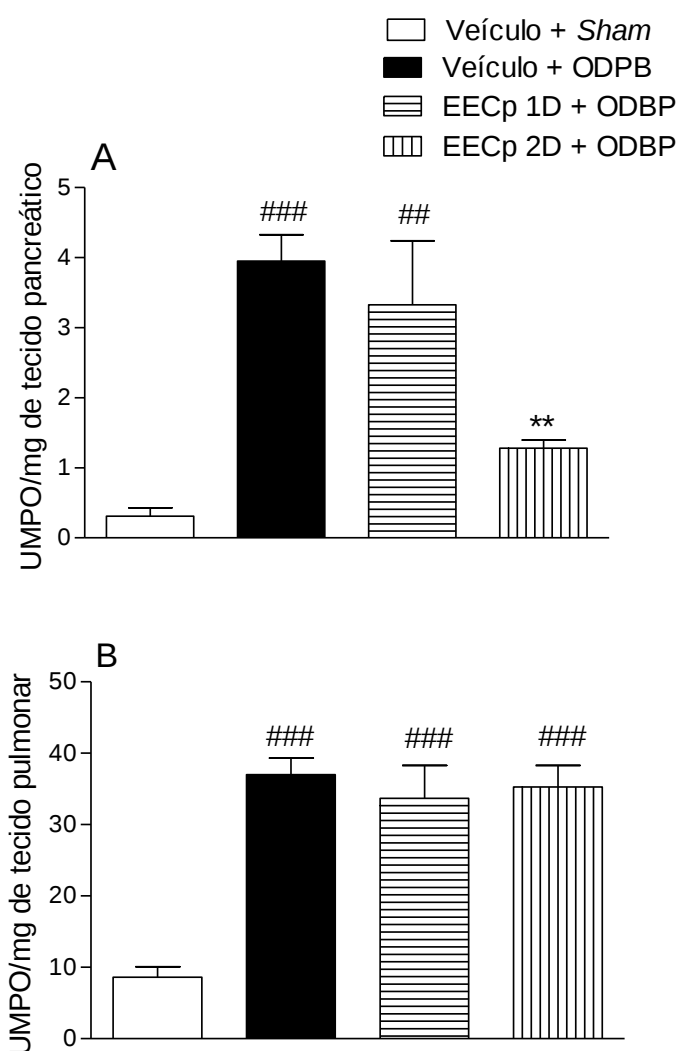
### 5.3 Efeito do EECp Sobre os Parâmetros Bioquímicos e Inflamatórios Avaliados 24 h Após a Indução da Pancreatite por ODBP

#### 5.3.1 Atividade de MPO, Índice de Edema e Contagem Total e Diferencial dos Leucócitos

Em relação aos grupos de animais cuja eutanásia foi realizada 24 h após a indução da pancreatite por ODBP, foi observado que, semelhante ao verificado no protocolo 1, houve aumento significativo da atividade de MPO pancreática e pulmonar ( $P < 0,001$ , de acordo com a Figura 10), quando comparados com o grupo *sham*. A dose de 400 mg/kg do EECp quando administrada 1 h antes e 12 h após a indução da pancreatite reduziu ( $P < 0,01$ ) a atividade de MPO no tecido pancreático, quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo, o que não foi observado com a administração do extrato apenas 1 h antes da indução da pancreatite (Figura 10A). O grupo que recebeu 2 administrações de EECp não apresentou diferença em relação ao grupo veículo + *sham*. A atividade de MPO no pulmão não foi reduzida pelo tratamento único ou em 2 doses do EECp (Figura 10B).

O índice de edema pancreático mostrou-se aumentado ( $P < 0,01$ ) 24 h após a indução da pancreatite por ODBP no grupo de animais tratados com veículo ( $5,9 \pm 0,2$ ) em relação ao grupo *sham* ( $4,4 \pm 0,2$ ). Este índice foi reduzido no grupo em que foram administradas 2 doses de 400 mg/kg do EECp ( $4,5 \pm 0,1$ ;  $P < 0,01$ ), mas não no grupo que recebeu apenas o tratamento prévio com EECp ( $5,1 \pm 0,2$ ).

Também foi verificado aumento da contagem total de leucócitos e de células polimorfonucleares e mononucleares no sangue periférico dos ratos submetidos à ODBP que receberam veículo ( $P < 0,001$  vs veículo + *sham*, Tabela 3). Estas contagens (total e diferencial) foram reduzidas ( $P < 0,001$ ) tanto pela administração de dose única, quanto pela administração de 2 doses de 400 mg/kg do EECp (Tabela 3) nos animais com pancreatite, de modo que não se observou diferença entre as contagens nestes grupos quando comparadas com o grupo veículo + *sham*.



**Figura 10. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de mieloperoxidase (MPO) em pâncreas (A) ou pulmão (B).** Grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODPB ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi tratado com EECp (400 mg/kg). A atividade de MPO no tecido pancreático (A) ou pulmonar (B) é mostrada como média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos; ### $P$ <0,01 ou #### $P$ <0,001 vs veículo + *sham*, \*\* $P$ <0,01 vs veículo + ODPB. D=dose de EECp. (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

**Tabela 3. Contagem leucocitária total e diferencial no sangue periférico de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).**

| Grupos                | Leucócitos Totais<br>(x 10 <sup>6</sup> /mL) | Polimorfonucleares<br>(x 10 <sup>6</sup> /mL) | Mononucleares<br>(x 10 <sup>6</sup> /mL) |
|-----------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| <i>Sham</i> + Veículo | 2,6 ± 0,4                                    | 1,5 ± 0,5                                     | 1,1 ± 0,1                                |
| ODBP + Veículo        | 10,3 ± 0,8 <sup>####</sup>                   | 4,8 ± 0,6 <sup>####</sup>                     | 5,5 ± 1,3 <sup>####</sup>                |
| ODBP + EECp 1D        | 6,0 ± 1,9 <sup>***</sup>                     | 3,6 ± 1,4 <sup>***</sup>                      | 2,4 ± 0,6 <sup>***</sup>                 |
| ODBP + EECp 2D        | 5,1 ± 1,1 <sup>***</sup>                     | 2,5 ± 0,4 <sup>***</sup>                      | 2,6 ± 0,8 <sup>***</sup>                 |

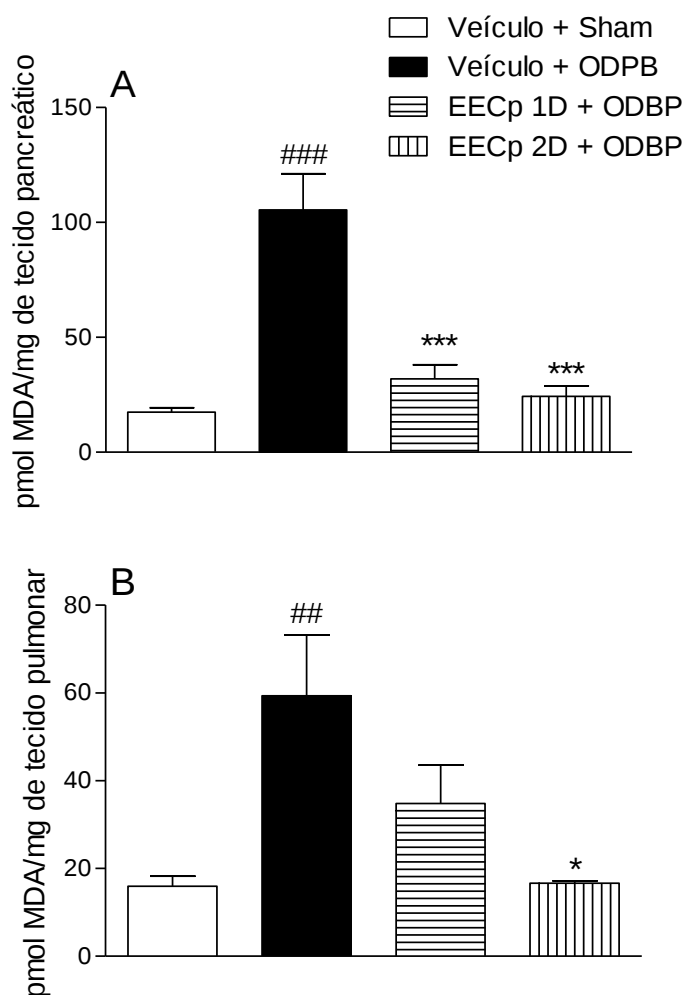
Grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi tratado com EECp (400 mg/kg). Os valores representam média ± EPM para n= 6-8; <sup>####</sup>P<0,001 vs *sham* ou <sup>\*\*\*</sup>P<0,001 vs ODBP + veículo. D=dose de EECp (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey).

### 5.3.3 Determinação de TBARS e de NO<sub>x</sub><sup>-</sup>

Nos grupos de animais eutanasiados 24 h após a indução da pancreatite por ODBP e tratados com veículo, observou-se um aumento na quantidade de MDA presente no pâncreas e no pulmão, (P<0,001 e P<0,01 vs veículo + *sham*, respectivamente). Além disso, a dose de 400 mg/kg do EECp, tanto administrada 1 vez, quanto 2 vezes, reduziu (P<0,001) as concentrações de MDA no tecido pancreático em relação aos grupos de animais tratados com veículo (Figura 11A). Em contrapartida, no tecido pulmonar os níveis de MDA foram diminuídos (P<0,05) apenas quando os animais foram tratados com as 2 administrações do EECp 400 mg/kg, em comparação com os animais com pancreatite que receberam veículo (Figura 11B). Em todos os grupos tratados com EECp não foi observada diferença significativa em relação aos grupos de animais veículo + *sham*.

Em relação à produção de MDA no fígado e no rim, a tabela 4 mostra que duas administrações de EECp (400 mg/kg) não alteraram a produção de

MDA pelo fígado em relação ao grupo veículo + *sham* ou ao grupo veículo + ODBP. No entanto, há uma tendência ao aumento do MDA no rim 24 h após a indução da pancreatite (Tabela 4).



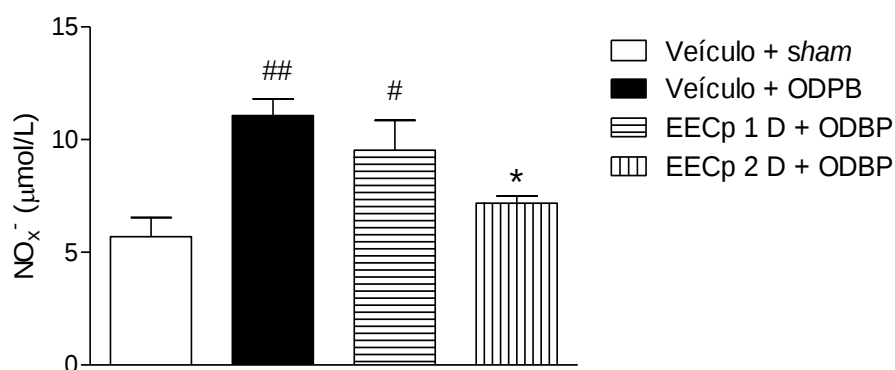
**Figura 11. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na concentração de malondialdeído (MDA) em pâncreas (A) ou pulmão (B).** Os grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi tratado com EECp (400 mg/kg). A concentração de MDA no tecido pancreático (A) ou pulmonar (B) é mostrada como média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos; ##  $P < 0,01$  ou ###  $P < 0,001$  vs veículo + *sham*, \* $P < 0,05$  ou \*\*\* $P < 0,001$  vs veículo + ODBP. D=dose de EECp (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

**Tabela 4. Concentração de MDA em fígado e rim de ratos tratados ou não com o extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp), 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).**

| Grupos                | Fígado<br>(pmol de MDA/mg de tecido) | Rim<br>(pmol de MDA/mg de tecido) |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Veículo + <i>sham</i> | 32 ± 5                               | 25 ± 1                            |
| Veículo + ODBP        | 41 ± 6                               | 55 ± 9                            |
| EECp 2D + ODBP        | 34 ± 6                               | 43 ± 12                           |

Os grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg), 1 h antes e 12 h após a indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Os valores representam média ± EPM para n=6-8; D=dose de EECp, (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey).

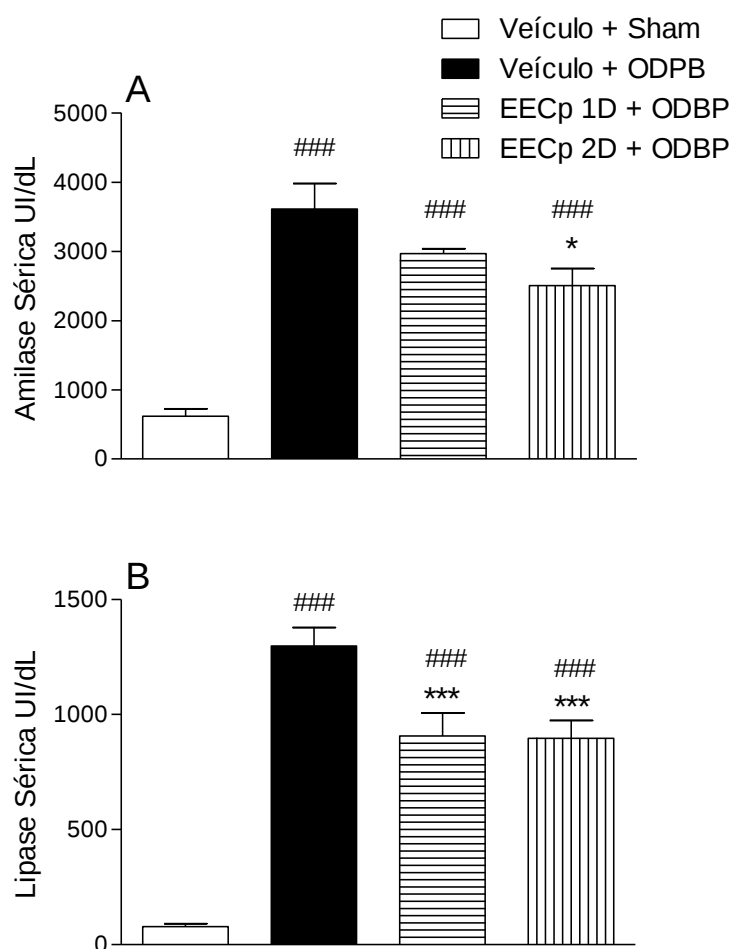
A concentração sérica de  $\text{NO}_x^-$  em animais com pancreatite induzida por ODBP foi maior ( $P < 0,01$ ) no grupo tratado com veículo, em relação aos animais *sham*. No grupo de animais com pancreatite que recebeu apenas a administração prévia do EECp não houve redução deste parâmetro quando comparado com o grupo veículo + ODBP. Entretanto, quando foram realizadas duas administrações do EECp, observou-se uma diminuição ( $P < 0,05$ ) dos níveis séricos de  $\text{NO}_x^-$ , em relação ao grupo veículo + ODBP, inclusive para valores que não diferiram dos observados no grupo veículo + *sham* (Figura 12).



**Figura 12.** Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP), na concentração sérica de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>). Os grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi tratado com EECp (400 mg/kg). A concentração sérica de NO<sub>x</sub> é mostrada com média ± EPM de 6-8 ratos; #P<0,01 ou ##P<0,01 vs veículo + *sham*; \*P<0,05 vs veículo + ODBP.. D= dose de EECp. (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

#### 5.3.4 Atividade de Amilase e Lipase Séricas

A pancreatite por ODBP elevou os níveis séricos de amilase e lipase 24 h após a sua indução em todos os grupos experimentais. Quando avaliado o efeito do EECp sobre os níveis de amilase sérica observou-se que estes foram reduzidos de maneira parcial no grupo de animais que recebeu 2 doses de 400 mg/kg de EECp (P<0,05; Figura 13A), o qual apresentou também diferença em relação ao grupo veículo + *sham* (P<0,001). A figura 13B mostra que a atividade de lipase sérica foi reduzida (P<0,001) em ambos os grupos de animais tratados com EECp, quando comparado ao grupo veículo + ODBP, no entanto, esta redução é parcial, já que existe diferença (P<0,001) entre os níveis desta enzima nos grupos submetidos aos tratamentos com EECp e o grupo *sham*.



**Figura 13.** Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) 24 h após a indução da pancreatite por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP) na atividade de amilase (A) ou lipase (B) séricas. Grupos de animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODPB ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi tratado com EECp (400 mg/kg). A atividade de amilase (A) e lipase (B) séricas são mostradas como média  $\pm$  EPM de 6-8 ratos, <sup>###</sup>P<0,001 vs veículo + *sham*, \*P<0,05 ou \*\*\*P<0,001 vs veículo + ODPB. D= dose de EECp. (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

#### 5.4 Efeito do EECp Sobre a Hiperalgesia Abdominal Durante a Pancreatite Aguda Induzida por ODBP e Sobre a Atividade Motora dos Animais

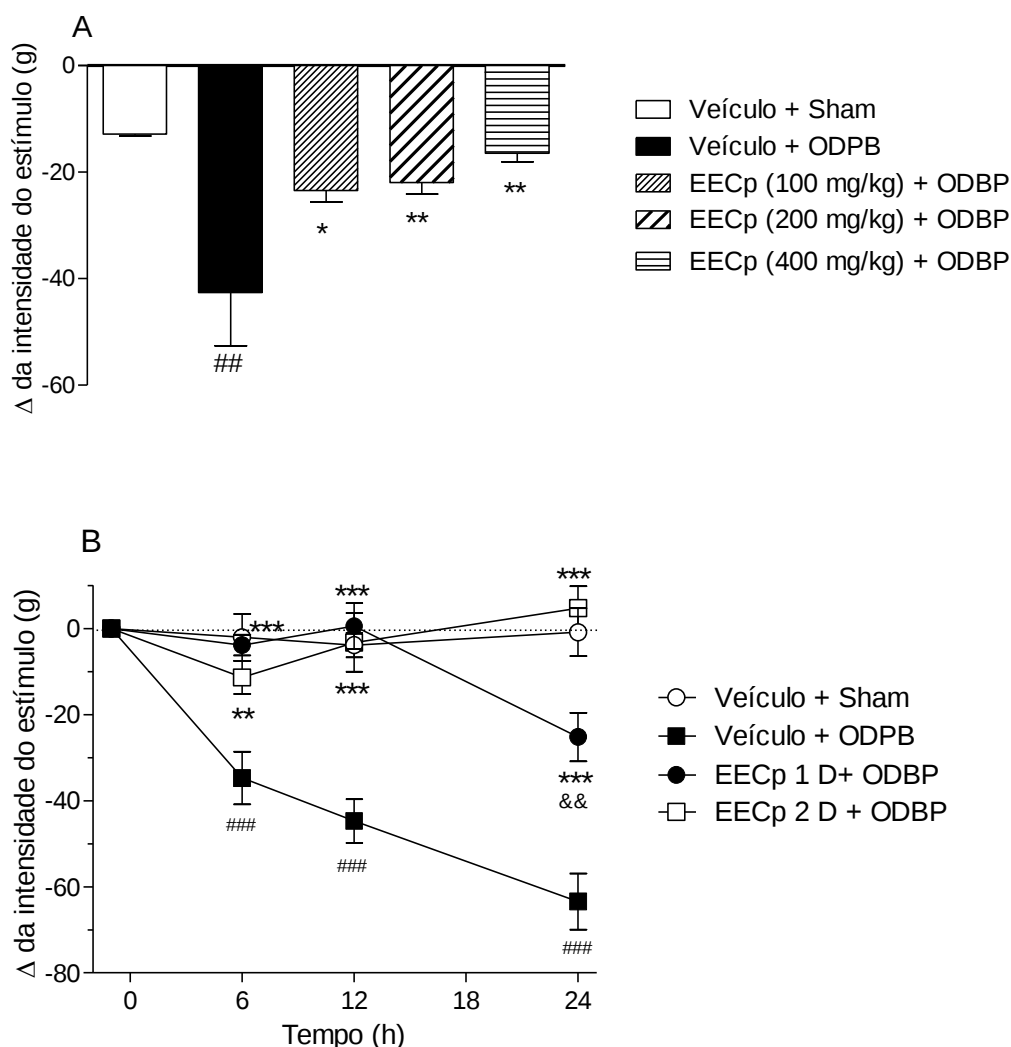
A indução da pancreatite pela ODBP foi acompanhada por hiperalgesia abdominal, detectada através da diminuição da intensidade do estímulo necessária para causar comportamento de retirada do abdômen dos animais após 6, 12 e 24 h da cirurgia ( $P<0,001$ ), quando comparado aos animais do grupo *sham* (Figura 14B).

A Figura 14A mostra que nos animais que receberam EECp nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, 1 h antes da indução da pancreatite aguda por ODBP, a variação da intensidade do estímulo (intensidade verificada 6 h após a indução da pancreatite por ODBP subtraída da intensidade verificada antes da indução) foi significativamente menor ( $P<0,05$ ,  $P<0,01$  e  $P<0,01$ , respectivamente) em relação aos animais com pancreatite induzida por ODBP, mas que receberam apenas veículo, denotando a redução da hiperalgesia abdominal.

Nos grupos de animais em que a eutanásia ocorreu 24 h após a indução da pancreatite, pode-se observar que 12 h após a indução, a hiperalgesia abdominal foi revertida significativamente nos animais com ODBP que receberam o tratamento com EECp na dose de 400 mg/kg (1 h antes da indução; Figura 14B). Vinte e quatro h depois da indução da pancreatite por ODBP, ambos os grupos tratados com EECp tiveram redução da hiperalgesia abdominal. Neste tempo, nos animais que receberam apenas uma dose prévia do EECp (1 h antes) foi observada uma redução parcial ( $P<0,01$ ) em comparação aos animais do grupo veículo + ODBP, que também foi diferente do grupo veículo + *sham* ( $P<0,01$ ). Entretanto, nos animais que receberam 2 doses do EECp (1 h antes e 12 h após a indução da pancreatite), a hiperalgesia abdominal foi totalmente revertida ( $P<0,001$ ; Figura 14B). Nestes grupos de animais foi verificada ainda uma interação estatística entre os fatores tempo experimental e tratamento a que os animais foram submetidos através de ANOVA de duas vias ( $P<0,0001$ ;  $F=10,91$ ).

Conforme esperado, o tratamento com morfina reduziu a variação da intensidade do estímulo necessário ao comportamento de retirada do abdômen dos animais 6 ( $13 \pm 1$  g,  $p < 0.001$ ), 12 ( $14 \pm 7$  g,  $p < 0.001$ ) e 24 h ( $-8 \pm 6$  g,  $p < 0.001$ ) após a indução da pancreatite aguda quando comparado com os animais que receberam apenas veículo ( $-35 \pm 6$ ,  $-45 \pm 5$  e  $-63 \pm 6$  g, respectivamente, 6, 12 e 24 h após a ODBP).

A capacidade de locomoção dos animais expostos ao EECp foi avaliada no teste do campo aberto, através do qual se quantificou o número de campos percorridos pelos animais mediante de administração de veículo ou EECp (400 mg/kg, 1 h antes) ou diazepam (1,5 mg/kg, 30 min antes). Não foi observada diferença entre o grupo de animais tratado com EECp e o grupo tratado com veículo, no entanto, houve diferença entre os grupos de animais que receberam veículo ( $P < 0,01$ ) ou EECp ( $P < 0,05$ ) em relação aqueles nos quais foi administrado diazepam. Decorridas 6 h da primeira entrada no campo, os animais foram recolocados no aparato (2ª Observação), e, de maneira semelhante, não foram detectadas diferenças significativas na capacidade de deambulação entre o grupos tratados com EECp ou com veículo, porém o tratamento com diazepam diminuiu o número de campos percorridos pelos animais ( $P < 0,01$  vs veículo; Tabela 5).



**Figura 14. Efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) na hiperalgesia abdominal durante a pancreatite induzida por obstrução do ducto biliopancreático (ODBP).** Painel A: Os ratos foram pré-tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (100, 200 e 400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou da falsa-cirurgia (*sham*) e a medida foi realizada 1 h antes e 6 h após. Painel B: Em outro experimento, os animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina) ou EECp (400 mg/kg) 1 h antes da indução da pancreatite por ODBP ou falsa-cirurgia (*sham*). Após 12 h da indução, todos os animais receberam tratamento com veículo, exceto o grupo EECp 2 doses que foi novamente tratado com EECp (400 mg/kg) e a medida foi realizada antes e entre 6-24 h após. A variação ( $\Delta$ ) da intensidade do estímulo mecânico foi avaliada e os dados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6-8$ ) em g. ## $P<0,01$  ou ### $P<0,001$  vs o respectivo grupo veículo + *sham*; \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  ou \*\*\* $P<0,001$  vs o respectivo grupo veículo + ODBP e && $P<0,01$  vs o respectivo grupo EECp 2 doses + ODBP. D= dose de EECp. (A) ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey; (B) ANOVA de duas vias ( $P<0,001$  e  $F=10,91$  para interação tempo vs tratamento) e ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey em cada tempo experimental.

**Tabela 5. Ausência de efeito do extrato etanólico da *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) na atividade locomotora de ratos no campo aberto**

| Grupos               | 1ª Observação<br>(frequência de locomoção) | 2ª Observação<br>(frequência de locomoção) |
|----------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Veículo              | 33 ± 1                                     | 22 ± 5                                     |
| EECp (400 mg/kg)     | 29 ± 3                                     | 17 ± 2                                     |
| Diazepam (1,5 mg/kg) | 12 ± 3**                                   | 3 ± 1**                                    |

Os animais foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,2% em salina), EECp (400 mg/kg, 1 h antes) ou diazepam (1,5 mg/kg, 30 min antes) da primeira entrada no campo aberto (1ª observação). Após 6 h da primeira entrada no campo, os animais foram recolocados no aparato de campo aberto (2ª observação). Foi avaliado o número de campos percorridos em 4 min, após 1 min de ambientação. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=6).

\*\*P<0,01 vs o respectivo grupo veículo. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

## 5.5 Sumário dos resultados obtidos com os tratamentos

A tabela 6 mostra o resumo dos dados obtidos com os tratamentos com EECp no modelo de pancreatite aguda induzida por ODBP em ratos.

**Tabela 6. Resumo dos efeitos do extrato etanólico de *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) sobre a pancreatite aguda induzida por ODBP em ratos.**

| Parâmetro avaliado           | Protocolo 1 (6 h) |     |     | Protocolo 2 (24 h) |          |
|------------------------------|-------------------|-----|-----|--------------------|----------|
|                              | EECp (mg/kg)      |     |     | EECp (mg/kg)       |          |
|                              | 100               | 200 | 400 | 400 (1D)           | 400 (2D) |
| MPO pancreática              | A                 | A   | ↓   | A                  | ↓        |
| MPO pulmonar                 | ↓                 | ↓   | ↓   | A                  | A        |
| Índice de edema pancreático  | A                 | A   | A   | A                  | ↓        |
| Leucócitos totais, PMN e MN  | ↓                 | ↓   | ↓   | ↓                  | ↓        |
| MDA pancreático              | A                 | A   | ↓   | ↓                  | ↓        |
| MDA pulmonar                 | A                 | A   | ↓   | A                  | ↓        |
| NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> | A                 | A   | ↓   | A                  | ↓        |
| Amilase sérica               | A                 | ↓   | ↓   | A                  | ↓        |
| Lipase sérica                | ↓                 | ↓   | ↓   | ↓                  | ↓        |
| Hiperálgia abdominal         | ↓                 | ↓   | ↓   | ↓                  | ↓        |

A presença ou ausência de efeito para cada esquema de tratamento com EECp está indicada conforme segue: (↓), diminuição significativa ou (A) ausência de efeito. As doses de EECp foram administradas conforme descrito nos Métodos. MPO= mieloperoxidase; MDA=malondialdeído, NO<sub>x</sub><sup>-</sup>= concentração de nitrito e nitrato PMN=leucócito polimorfonuclear; MN=leucócito mononuclear, D= dose de EECp..

## 6 DISCUSSÃO

O uso popular da *Caesalpinia pyramidalis* para o tratamento de condições inflamatórias (ALBUQUERQUE et al., 2007), associado aos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos descritos em animais de experimentação (SANTOS et al., 2011), direcionou o desenvolvimento do presente estudo, que envolveu o modelo de ODBP para avaliar o efeito protetor do EECp sobre os parâmetros inflamatórios e nociceptivos, que são induzidos pela pancreatite. Contudo, também é considerado de interesse o conhecimento dos componentes deste extrato. A alta quantidade de flavonóides no extrato etanólico da entrecasca de *Caesalpinia pyramidalis* (SILVA et al., 2011) foi fator decisivo para o desenvolvimento de um método cromatográfico para a comparação do cromatograma do EECp com padrões de flavonóides conhecidos por suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, como rutina, apigenina, quercetina e baicaleína. Dos flavonóides escolhidos, apenas a presença de apigenina já havia sido relatada na fração clorofórmica do extrato das folhas dessa espécie (BAHIA et al., 2005).

O presente estudo descreve pela primeira vez a análise cromatográfica do EECp. Nas condições estudadas, este estudo demonstrou que é possível que o flavonóide rutina esteja presente no EECp, pois houve correspondência no tempo retenção entre um dos picos presentes no cromatogramas do EECp e o pico correspondente ao padrão deste flavonóide. Além disso, quando o extrato foi fortificado com o padrão de rutina observou-se um aumento da área do pico coincidente. No entanto, para a completa confirmação, o isolamento precisará ser realizado. A rutina é um flavonóide glicosilado com propriedades farmacológicas bem estabelecidas, a exemplo da sua ação protetora no endotélio, contra as lesões causadas pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade, além de atividade anti-inflamatória e antioxidante (KAUSS et al., 2008). Pelo método cromatográfico utilizado, os demais flavonóides não foram

detectados, entretanto o extrato apresentou outros picos importantes para flavonóides e estudos futuros delinearão os compostos presentes no mesmo.

A pancreatite induzida por ODBP é um modelo muito útil, por ser econômico e por mimetizar os estágios iniciais da pancreatite induzida por litíase em humanos, e assim, possibilitar a investigação dos eventos fisiopatológicos desta condição, associados à lesão acinar e à inflamação aguda pancreática e sistêmica (SAMUEL et al., 2005; MEYERHOLZ et al., 2008). No presente estudo, a indução da pancreatite aguda ficou evidenciada bioquimicamente pelo aumento da atividade de MPO, da concentração de MDA e do índice de edema no pâncreas, bem como pelo aumento dos níveis de amilase e lipase séricas. Os efeitos sistêmicos da pancreatite foram detectados principalmente no pulmão, onde ocorreu aumento da atividade de MPO e da concentração de MDA, além do aumento da concentração sérica de  $\text{NO}_x^-$  e da contagem leucocitária total e diferencial elevada no sangue periférico. Adicionalmente, observou-se a diminuição do limiar hipernociceptivo no abdômen dos ratos, o que denota o desenvolvimento de hiperalgesia abdominal. Ao que se conhece, este é o primeiro estudo que caracteriza um fenômeno semelhante à dor no modelo de ODBP em ratos.

No modelo de pancreatite por ODBP, foi possível observar aumento da atividade de MPO pancreática e pulmonar a partir da 6<sup>a</sup> h, que é intensificado no pâncreas na 24<sup>a</sup> h após a indução da pancreatite (SEVILLANO et al., 2003). O EECp reduziu a atividade de MPO no tecido pancreático, em ambos os tempos experimentais. Esta redução também foi observada no pulmão, porém apenas na 6<sup>a</sup> h após a indução da pancreatite. Desta forma, pode-se inferir que o EECp diminuiu a infiltração de neutrófilos local (no pâncreas) e sistêmica (no pulmão), contribuindo para a redução da intensidade do quadro inflamatório na pancreatite induzida por ODBP em ratos.

Os extratos de plantas do gênero *Caesalpinia*, como a *C. pulcherrima* e a *C. bonducella*, possuem atividade anti-inflamatória comprovada através de estudos realizados em animais de experimentação (ARCHANA et al., 2005; RAO, FANG, TZENG, 2005). O extrato etanólico da entrecasca de *Caesalpinia*

*pyramidalis*, no estudo de Santos *et al.*, (2011), quando administrado na dose de 400 mg/kg, reduziu a migração de neutrófilos induzida por carragenina para a pata de ratos, bem como, diminuiu a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal de camundongos, também induzida por carragenina, o que confirma o seu uso na medicina popular para condições inflamatórias. Estes resultados corroboram os observados no presente estudo e permitem sugerir que o EECp possui importante participação na inibição da migração de leucócitos durante o processo inflamatório local e sistêmico.

O edema pancreático ocorre nos estágios iniciais da pancreatite aguda e a extensão total do edema se correlaciona com a gravidade da doença (GRADY *et al.*, 2000). Durante o curso do processo inflamatório, a liberação de aminas vasoativas dá início ao edema que é sustentado pela posterior liberação de PG e NO (COUTURE *et al.*, 2001). No modelo de pancreatite por ODBP, o incremento no índice de edema ocorre após 24 h, tendo um segundo aumento 48 h depois da indução da pancreatite (MEYERHOLZ *et al.*, 2008). Estes dados confirmam os achados do presente estudo, no qual o aumento do índice de edema foi observado 24 h após a indução da pancreatite, aumento este que não ocorreu no grupo de animais em que foram administradas 2 doses de 400 mg/kg de EECp. Vale ressaltar que esta mesma dose de EECp foi usada por Santos *et al.* (2011) para reduzir o edema de pata induzido por carragenina em ratos.

É interessante destacar o efeito anti-inflamatório do EECp no tecido pulmonar, pois isso tem um grande interesse clínico, dado que a lesão pulmonar é o principal determinante da gravidade do quadro de pancreatite aguda (MEYERHOLZ *et al.*, 2008). Muitos fatores podem estar envolvidos na lesão pulmonar associada à pancreatite, como o grau de lesão celular, a presença de enzimas ativadas, a destruição do surfactante pulmonar, a participação de citocinas e de mediadores inflamatórios e a perfusão pulmonar deficiente (WANG *et al.*, 2008). Além disso, a lesão pulmonar é o principal efeito secundário da pancreatite aguda relacionado à mortalidade dos pacientes (McKAY, BUTTER, 2003). Estima-se que aproximadamente 60% dos casos de morte durante a pancreatite aguda sejam devidos à falência pulmonar

(ZHOU et al., 2010). Dessa maneira, estratégias que também visem diminuir a lesão pulmonar associada à pancreatite podem ser úteis para diminuir a mortalidade ou a morbidade decorrente desta doença.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo, os grupos de animais tratados com EECp apresentaram atividades de MPO pulmonar mais baixas que a observada no grupo tratado com veículo, decorridas 6 h da indução da pancreatite por ODBP, no entanto, o EECp não alterou a MPO pulmonar 24 h após a indução da pancreatite por ODBP, mesmo quando foram administradas duas doses de 400 mg/kg do extrato. Este achado mostra o efeito protetor sistêmico do EECp nos estágios iniciais da pancreatite, o qual não é sustentado em tempo posterior, o que pode estar relacionado ao fato da lesão pancreática ser grave e de causa persistente no modelo de pancreatite adotado, com características de pancreatite hemorrágica, o que leva a um maior comprometimento pulmonar.

Neste estudo, a pancreatite induzida por ODBP foi acompanhada por aumento das concentrações de amilase e lipase séricas, tanto 6 quanto 24 h após a obstrução do ducto biliopancreático de ratos, o que concorda com estudos prévios (HIRATA, et al., 2002; BARRET, et al., 2008). A administração de 400 mg/kg do EECp reduziu parcialmente os níveis de amilase sérica nos animais com pancreatite em ambos os protocolos experimentais avaliados, o que sugere um papel protetor deste extrato no pâncreas. Embora seja parcial, esta redução é de suma importância para o quadro inflamatório pancreático, pois pode denotar maior proteção do pâncreas, mesmo frente à falta de alteração da causa de lesão tecidual, pois a ODBP induzida cirurgicamente não é reversível.

Observou-se ainda que todas as doses administradas em ambos os protocolos utilizados (6 ou 24 h após a indução da pancreatite), contribuíram para níveis de lipase inferiores aos observados nos respectivos grupos com pancreatite tratados apenas com veículo. Isto contrasta com o efeito sobre os níveis séricos de amilase, que foram reduzidos pelo EECp apenas nas maiores doses (200-400 mg/kg) ou número de doses (2 administrações) deste

extrato. A explicação para esses fatos não é certa, mas sugere-se que diferentes cinéticas de liberação e depuração destas enzimas devam estar envolvidas. A atividade de amilase sérica 24 h após a indução da pancreatite por ODBP no grupo tratado com veículo é três vezes menor que a atividade no grupo correspondente (eutansiado após 6 h de indução da pancreatite), mostrando assim o decréscimo espontâneo que ocorre nos níveis de amilase já nas primeiras 24 h do quadro de pancreatite aguda, o que não ocorre com os níveis de lipase. A determinação do nível de lipase é preferível ao de amilase, pois a primeira frequentemente se apresenta em níveis normais em casos de hiperamilasemia por condições não pancreáticas, sendo a dosagem de lipase mais sensível e específica que a de amilase (BANKS, FREEMAN, 2006).

Um dos fatores que pode ser determinante na lesão pulmonar é a presença de enzimas pancreáticas ativadas, que alcançaram o pulmão via circulação (AL MOFLEH, 2008). Pode-se sugerir que o efeito apenas parcial do EECp, observado no presente estudo, sobre os níveis de amilase e lipase séricas dos animais, esteja associado à menor atividade modulatória sobre a atividade de MPO no pulmão. Esta redução na atividade enzimática pode ter ocorrido também com outras enzimas envolvidas na patogênese da pancreatite aguda, mas que não foram quantificadas neste estudo, como a tripsina e a PLA<sub>2</sub>.

Ainda em relação à resposta inflamatória sistêmica, paralelamente ao desenvolvimento da pancreatite, ocorreu o aumento dos leucócitos no sangue periférico, o que deve estar relacionado com a instauração do quadro inflamatório local e secundário. Este recrutamento de células inflamatórias da medula óssea para a circulação é favorecido por mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas e citocinas como o TNF- $\alpha$  (DIOS et al., 2002). A contagem de leucócitos pode ser considerada no prognóstico da pancreatite aguda, pois antecede a infiltração de leucócitos para o pâncreas e outros tecidos, principalmente nas fases iniciais da pancreatite (YOSHINAGA, WASHIZUKA, SEGAWA, 2000). No presente estudo, a indução da pancreatite por ODBP elevou as contagens total e diferencial de leucócitos, que foram diminuídas pela administração do EECp nos dois protocolos experimentais

estudados e em todas as doses investigadas, denotando o potencial efeito anti-inflamatório sistêmico deste extrato.

Este potencial foi inicialmente descrito por Santos *et al.* (2011), validando o uso popular da planta nos modelos inflamatórios de edema de pata e peritonite, estudo em que parte dos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos observados foi atribuída ao potencial antioxidante do EECp. Considerando-se estes achados, foi realizada, em nosso estudo, a determinação da produção de MDA, como medida da peroxidação lipídica causada como consequência da produção de radicais livres no processo inflamatório pancreático e pulmonar.

As espécies reativas de oxigênio são consideradas importantes mediadores no curso da pancreatite aguda (SEVILLANO *et al.*, 2003). No modelo de pancreatite por ODBP foi observado um pico de produção de MDA pancreático 6 h após a indução da pancreatite, que decresceu 24 h depois da indução e, passadas 48 h, chegou a valores próximos aos encontrados no grupo *sham* (SEVILLANO *et al.*, 2003). Os resultados do presente trabalho, contrastam, em parte, com os de Sevillano *et al.* (2003), pois apesar de ter sido observado aumento do MDA pancreático 6 h depois da indução da pancreatite por ODBP, esta elevação também foi observada 24 h após a ODBP.

No presente estudo, observou-se que o EECp reduziu a formação de MDA no pâncreas e no pulmão de ratos submetidos à pancreatite por ODBP. A propriedade antioxidante *in vitro* do extrato de *C. pyramidalis* já foi descrita através do ensaio de DPPH (ALVIANO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011) e de capacidade de quelação do íon ferro (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, a alta concentração de flavonóides no extrato desta planta descrita por Silva *et al.* (2011) e a possível presença de rutina, observada pela análise cromatográfica deste extrato, podem contribuir para o efeito antioxidante do EECp (ROTELLI *et al.*, 2003).

Outra espécie química altamente reativa que tem importante papel na pancreatite aguda é o NO, quantificado indiretamente através da concentração

de seus metabólitos, nitrato e nitrito, no filtrado do soro. A ODBP levou a um aumento dos níveis séricos de  $\text{NO}_x^-$ , em ambos os protocolos experimentais, e os tratamentos com dose única de 400 mg/kg de EECp no protocolo 1 (eutanásia 6 h após a indução da pancreatite), e com duas doses de EECp no protocolo 2 (eutanásia 24 h após a indução da pancreatite) impediram a elevação dos níveis destes metabólitos. O aumento sérico dos níveis de  $\text{NO}_x^-$  está associado com a gravidade da pancreatite aguda experimental (ZHANG, et al., 2007). Acredita-se que este aumento deve-se, principalmente, à indução da produção de NO via iNOS (DiMAGNO, 2007).

A atividade anti-inflamatória e antioxidante observada para o EECp no modelo de pancreatite induzida por ODBP, indica um potencial para este extrato como fonte de substâncias para o tratamento da pancreatite aguda. Contudo, umas das características marcantes desta patologia em humanos é a dor abdominal, que se manifesta como um grave desconforto epigástrico nas porções superiores do abdômen, mas que pode se expandir a região inferior (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2005; KAWABATA et al., 2006).

Nos modelos animais de pancreatite, a nocicepção visceral é caracterizada como a variação das respostas ao estímulo mecânico nas áreas abdominais (VERA-PORTOCARRERO, LU, WESTLUND, 2003). Esta resposta foi previamente observada, através do uso de filamentos de von Frey, nos modelos de pancreatite aguda induzida por ceruleína em camundongos (KAWABATA et al., 2006; MICHALSKI et al., 2007) e por L-arginina em ratos (WINSTON et al., 2003). Adicionalmente, na pancreatite crônica induzida por dicloreto de dibutiltin (VERA-PORTOCARRERO, WESTLUND, 2004) ou ácido trinitrobenzeno sulfônico (WINSTON et al., 2005), ambos em ratos, os filamentos de von Frey também foram utilizados para caracterizar as alterações da resposta comportamental dos animais com pancreatite.

Recentemente, o von Frey eletrônico foi utilizado para avaliar a hiperalgesia abdominal no modelo de pancreatite aguda induzida por injeção intraductal de  $\text{PLA}_2$  secretória, que envolve a laparotomia para a indução da pancreatite aguda e estimulação da região abdominal, após 4 h da cirurgia, que

representa um tempo experimental consideravelmente curto (CAMARGO et al., 2011). Apesar disto, o estudo de Camargo *et al.* (2011) demonstrou, de forma interessante, que após 4 h da laparotomia os animais injetados com salina não apresentaram alterações significativas do limiar de retirada do abdômen.

O presente estudo vem demonstrar, pela primeira vez, que após a ODBP ocorre o desenvolvimento de hiperalgesia abdominal. Esta foi caracterizada pela diminuição significativa do limiar de estímulo mecânico, aplicado na região abdominal, necessária para induzir um comportamento de retirada nos animais, quando comparada com os animais do grupo *sham*. Estes resultados indicam que na pancreatite aguda induzida por ODBP pode-se observar a sensibilização da região abdominal, o que se assemelha com a pancreatite em humanos.

Neste estudo, demonstrou-se que nos animais com pancreatite induzida por ODBP e tratados com EECp, em todas as doses, a hiperalgesia abdominal foi reduzida substancialmente, 6 h após a indução da pancreatite, inclusive a valores que não diferiram do grupo *sham*. A diminuição da hiperalgesia abdominal nos animais que receberam o EECp é reforçada pela atividade antinociceptiva observada no estudo de Santos *et al.* (2011), onde o EECp reduziu a nocicepção em testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e placa quente, sugerindo que pode existir algum componente analgésico na planta em estudo.

A maior parte dos testes para avaliação da atividade antinociceptiva é realizada em tempos experimentais relativamente curtos (1-4 h), a exemplo da nocicepção induzida por formalina ou ácido acético (MOGIL, CRAGER, 2004). A pancreatite induzida pela ODBP possui a vantagem de permitir avaliações da hiperalgesia em tempos posteriores, como 12 e 24 h após a sua indução, a fim de avançar no entendimento da duração da ação anti-hiperalgésica das substâncias em teste. Desta forma, foi observado que a hiperalgesia abdominal aumentou gradativamente após 6, 12 e 24 h após da indução da pancreatite aguda por ODBP. O tratamento prévio dos animais com a dose 400 mg/kg de EECp inibiu a hiperalgesia abdominal nos tempos de 6 e 12 h após a ODPB,

em comparação aos animais tratados com veículo. Vinte e quatro h após indução da pancreatite ainda foi observado uma reversão parcial da hiperalgesia nos animais que receberam apenas uma dose do EECp, mas nos animais que receberam a segunda administração do EECp, na mesma dose, após 12 h da ODBP, a reversão total da hiperalgesia foi mantida. Da mesma forma, o tratamento com morfina reverteu a hiperalgesia abdominal dos animais, o que se assemelha ao observado por Vera-Portocarrero, Lu e Westlund (2003), em modelo de pancreatite induzida por dicloreto de dibutiltin em ratos.

Um efeito do EECp que poderia interferir na medida da hiperalgesia abdominal é a ação depressora central do mesmo, que pode ser avaliada, de maneira geral, através da investigação da atividade locomotora dos animais. Desta forma, realizou-se o teste do campo aberto a fim de se verificar a presença ou não de alterações na frequência de locomoção dos animais expostos ao tratamento com EECp. Assim, verificou-se que a dose de 400 mg/kg, a maior dose de EECp empregada neste estudo, não foi capaz de alterar a frequência de locomoção dos animais no campo aberto, diferente dos animais tratados com diazepam. Este resultado complementa o achado de Santos et al., (2011), no qual o EECp não alterou a atividade motora de camundongos submetidos ao teste do rota-rod.

Deste modo, a atividade antinociceptiva do EECp pode ser destacada, pois houve redução da hiperalgesia abdominal em todas as doses estudadas, em ambos os protocolos, mesmo em grupos cujas doses administradas não foram capazes de inibir a elevação dos parâmetros inflamatórios causados pela pancreatite aguda, mostrando que a atividade antinociceptiva do EECp não é exclusivamente decorrente de sua atividade anti-inflamatória.

Parte dos efeitos observados no presente trabalho pode se dever à presença da rutina no EECp, já que este flavonóide possui atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante (GUARDIA et al., 2001; OLSZANECKI et al., 2002; LAPA et al., 2009). Estudos prévios demonstraram que a rutina diminuiu o edema na pata e no joelho de ratos induzidos por

carragenina (GUARDIA et al., 2001;ROTELI et al., 2003), reduziu a nocicepção induzida por glutamato na pata de camundongos (LAPA et al., 2009), inibiu a inflamação renal induzida por cisplatina (ARJUMAND, SETH, SULTANA, 2011), bem como a cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos (BOEIRA et al., 2011). Além disso, OLSZANECKI et al., (2002) demonstraram a ação inibitória da rutina sobre a expressão de iNOS em cultura de macrófagos.

Finalmente, são necessários novos estudos, principalmente no que se refere à confirmação da presença de rutina e à elucidação dos outros constituintes químicos do EECp, bem como do mecanismo de ação relativo à suas atividades, destacando-se a atividade antinociceptiva.

## **7 CONCLUSÃO**

O EECp apresentou efeitos anti-inflamatório, antioxidante e anti-hiperalgésico no modelo de pancreatite induzida por ODPB, além de reduzir os níveis de enzimas pancreáticas no soro, sendo assim, de interesse para viabilizar estudos ou abordagens futuras para o tratamento da pancreatite em humanos.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABELA, J.; CARTER, C. R. Acute pancreatitis - a review. **Hepatobiliary Surgery II**, v. 28, n. 5, p. 205-11, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-40, 2007.
- AGRA, M. D. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P. D. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- AL MOFLEH, I. A. Severe acute pancreatitis: Pathogenetic aspects and prognostic factors. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 5, p. 675-84, 2008.
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 6, p. 545-552, 2008.
- ANDICAN, G. et al. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 15, p. 2340-45, 2005.
- ARCHANA, P. et al. Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 376-381, 2005.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 92-106, 2010.
- ARJUMAND, W.; SETH, A.; SULTANA, S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats. **Food and Chemistry Toxicology**; v. 49, p. 2013-21, 2011
- BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 6B, p. 1402-5, 2005.

BAHIA, M. V.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1297-1300, 2010.

BANG, U. C. et al. Pharmacological approach to acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 19, p. 2968-76, 2008.

BANKS, P. A.; FREEMAN, M. L. Practice Guidelines in Acute Pancreatitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, p. 2379-2400, 2006.

BARRETT, T.D. et al. Role of CCK and potential utility of CCK1 receptor antagonism in the treatment of pancreatitis induced by biliary tract obstruction. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 1650-1658. 2008.

BATHIA, M. et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 117-25, 2000.

BHATIA, M. et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 5, p. 132-44, 2005.

BEHRMAN, S. W.; FOLWER, E. S. Pathophysiology of chronic pancreatitis. **Surgery Clinics of North America**, v. 87, p. 1309-24, 2007.

BOEIRA, V.T. et al. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn's Schmiedebergs Archives Pharmacology**, v. 384, p.265-275, 2011.

BOSE R, SUTHERLAND GR, PINSKY C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochemical Research**, v. 14, p. 217-220, 1989.

BOUGUEN, G.; CHEVAUX, J.; PEYRIN-BIROULET, L. Recent advances in cytokines: Therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 547-56, 2011.

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigation in Dermatology**, v. 78, p. 206-9, 1982.

BRADLEY, I. E. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis. **Archives of Surgery**, v. 128, p. 286-90, 1993.

BRASIL. Decreto-Lei nº 5813 de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, v. 126, n. 119, 23 jun. 2006a. Seção 1, pt. 1, p. 1.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasília: MS, v. 1, 92p, 2006b.

BRASIL. **Quarto Relatório Nacional Para a Convenção Sobre Diversidade Biológica - BRASIL**. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Brasília, p. 248. 2011.

CAMARGO, E. A. et al. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A<sub>2</sub>. **Pancreas**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2008.

CAMARGO, E. A. et al. Abdominal hyperalgesia in secretory phospholipase A<sub>2</sub>-induced rat pancreatitis: Distinct roles of NK1 receptors. **European Journal of Pain**, p. (in press), 2011.

CAPAZ, F. R. et al. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 251, n. 2, p. 228-236, 1981.

CEYHAN, G. O. et al. Pancreatic Pain. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 31-44, 2008.

CHAN, Y. C.; LEUNG, P. S. Involvement of Redox-Sensitive Extracellular-Regulated Kinases in Angiotensin II-Induced Interleukin-6 Expression in Pancreatic Acinar Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329, p. 450-8, 2009.

CHENG, Y et al. A new cassane diterpenoid lactone from the seed of *Caesalpinia minax*". **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 444-446, 2009.

CINP - CENTRO NORDESTINO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS. **www.cnip.org.br**, 2011. Disponível em: <[http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Catinga%20de%20Porco/index.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Catinga%20de%20Porco/index.html)>. Acesso em: 19 de Setembro de 2011.

ÇOL, C. et al. Exogenous melatonin treatment reduces hepatocyte damage in rats with experimental acute pancreatitis. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, v. 17, n. 5, p. 682-687, 2010.

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 161-76, 2001.

CUZZOCREA, S. et al. Reduction in the development of cerulein-induced acute pancreatitis by treatment with M40401, a new selective superoxide dismutase mimetic. **Shock**, v. 22, n. 3, p. 254-61, 2004.

DABROWSKI, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 377, p. 1-11, 1999.

DESMARCHELIER, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DiMAGNO, M. J. Nitric Oxide Pathways and Evidence-Based Perturbations in Acute Pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, p. 403-8, 2007.

DiMAGNO, M. J. et al. Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. **American Journal Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 287, p. G80-7, 2004.

DIOS, I. et al. Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. **Cytokine**, v. 20, n. 6, p. 295-303, 2002.

DIOS, I.; URUÑUELA, A.; MANSO, M. Effects of early decompression and cholecystokinin inhibition in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 141, n. 4, p. 265-271, 2003.

DIOS, I. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2010.

ESCH, A. A. et al. Pharmacological management of pain in chronic pancreatitis. **Digestive and liver disease**, v. 38, p. 518-26, 2006.

FORSMARK, C. E.; BAILLIE, J. AGA Institute Technical Review on Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2022-2044, 2007.

FROSSARD, J.-L.; STEER, M. L.; PASTOR, C. M. Acute pancreatitis. **The Lancet**, v. 371, p. 143-52, 2008.

GENOVESE, T. et al. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Shock**, v. 25, n. 2, p. 161-167, 2006.

GRADY, E. F. et al. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 505-12, 2000.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER JR, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods in Enzimology**, v. 268, p. 237-246, 1996.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**. v. 56, p. 683-687, 2001.

GUTIERREZ, P. T. et al. Oxidised lipids present in ascitic fluid interfere with the regulation of the macrophages during acute pancreatitis, promoting an exacerbation of the inflammatory response. **Gut**, v. 57, p. 642-8, 2008.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-55, 2004.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HOGAN, Q. Animal Pain Models. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n. 4, p. 385-401, 2002.

IASP. **Classification of chronic pain**: descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, n. 2, 1994.

ISHIKURA, H. et al. The proteinase inhibitor camostat mesilate suppresses pancreatic pain in rodents. **Life Science**, v. 80, n. 21, p. 1994-2004, 2007.

JAWOREK, J. et al. Brain-gut axis in the modulation of pancreatic enzyme secretion. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 523-531, 2010.

KAUSS, T. et al. Rutoside decreases human macrofage-derived inflammatory mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. **Arthritis Research e Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2008.

KAWABATA, A. et al. Suppression of pancreatitis-related allodynia/hyperalgesia by proteinase-activated receptor-2 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 54-60, 2006.

KIBA, T. Relationships Between the Autonomic Nervous System and the Pancreas Including Regulation of Regeneration and Apoptosis: Recent Developments. **Pancreas**, v. 29, p. e51-58, 2004.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, 2005.

LAIRD, J. M. A. et al. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. **Pain**, v. 92, p. 335-42, 2001.

LAPA, F.R., Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, p. 306-315, 2009.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEUNG, P. S.; IP, S. P. Pancreatic acinar cell: Its role in acute pancreatitis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1024-1030, 2006.

McKAY, C. J.; BUTTER, A. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 3, p. 111-4, 2003.

MEHTA, S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. **Vascular Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 390-403, 2005.

MENDES, C. C. et al. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 205-207, 2000.

MEYERHOLZ, D. K. et al. Murine pancreatic duct ligation induces stress kinase activation, acute pancreatitis, and acute lung injury. **The American Journal of Surgery**, v. 196, n. 5, p. 675–682, 2008.

MICHALSKI, C. W. et al. Cannabinoids Ameliorate Pain and Reduce Disease Pathology in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 132, p. 1968-78, 2007.

MOGIL, J. S.; CRAGER, S. E. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? **Pain**, v. 112, p. 12-5, 2004.

MONFARED, S. S. M. S. et al. Antioxidant therapy in the management of acute, chronic and post-ERCP pancreatitis: A systematic review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 36, p. 4881-90, 2009.

MOOREN, F. C. et al. Early Changes in Pancreatic Acinar Cell Calcium Signaling after Pancreatic Duct Obstruction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9261-9, 2003.

NATHAN, J. D. et al. Primary sensory neurons: a common final pathway for inflammation in experimental pancreatitis in rats. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, p. G938-G946, 2002.

NOBLE, M. D.; LIDDLE, R. A. Neurohormonal control of exocrine pancreatic secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 531-37, 2005.

OLSZANECKI, R. et al. Flavonoids and nitric oxide synthase. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 571-584, 2002.

OMS. **Monographs on selected medicinal plants**. v. 1, p. 3 1999.

OREBAUGH, S. L. Normal amylase levels in the presentation of acute pancreatitis. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 12, n. 1, p. 21-24, 1994.

OSMAN, M. O. et al. Profiles of pro-inflammatory cytokines in the serum of rabbits after experimentally induced acute pancreatitis. **Cytokine**, v. 17, n. 1, p. 53-9, 2002.

PANDOL, S. J. et al. Acute Pancreatitis: Bench to Beside. **Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p. 1056e1-e25, 2007.

PAPACHRISTOU, G. I. Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 41, p. 6273-75, 2008.

RAMUDO, L. et al. Kinetic study of TNF-alpha and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. **Journal of Pathology**, v. 206, p. 9-16, 2005.

RAMUDO, L. et al. ICAM-1 and CD11b/CD18 Expression During Acute Pancreatitis Induced by Bile-Pancreatic Duct Obstruction: Effect of N-Acetylcysteine. **Experimental in Biology Medicine**, v. 232, p. 737-43, 2007.

RAO, Y. K.; FANG, S.; TZENG, Y. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 249-253, 2005.

RAU, B. et al. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis. Initiating event or mediator in tissue damage?. **Annals of Surgery**, v. 231, p. 352-360, 2000.

ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.

SAMUEL, I. et al. Ligation-Induced Acute Pancreatitis in Rats and Opossums: A Comparative Morphologic Study of the Early Phase. **Journal of Surgical Research**, v. 57, n. 2, p. 299-311, 1994.

SAMUEL, I. et al. Exacerbation of acute pancreatitis by combined cholinergic stimulation and duct obstruction. **The American Journal of Surgery**, v. 190, p. 721-724, 2005.

SANTOS, C. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, (in press), 2011.

SERPELL, M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Surgery**, v. 24, n. 10, p. 351-3, 2006.

SEVILLANO, S. et al. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis.

**Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1639, p. 177-184, 2003.

SHI, C. et al. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. **Pancreatology**, v. 5, p. 492-500, 2005.

SHRIVASTAVA, P.; BHATIA, M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 32, p. 3995-4002, 2010.

SILVA, C. H. T. P. et al. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 16, p. 4728-4739, 2011.

SILVA, A. C. O. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2005.

SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - *Caesalpinaceae*) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - *Rhamnaceae*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 263-269, 1998.

SPANIER, B. W. M.; DIJKGRAAF, M. G. W.; BRUNO, M. J. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 45-63, 2008.

STEIN, C. et al. Peripheral Mechanisms of Pain and Analgesia. **Brain Research Review**, v. 60, n. 1, p. 90-113, 2009.

SUN, W.; WATANABE, Y.; WANG, Z. Expression and significance of ICAM-1 and its counter receptors LFA-1 and Mac-1 in experimental acute pancreatitis of rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 31, p. 5005-9, 2006.

TAMIZHSELVI, R. et al. Preprotachykinin-A Gene Deletion Regulates Hydrogen Sulfide-Induced Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway in Cerulein-Treated Pancreatic Acinar Cells. **Pancreas**, v. 40, n. 3, p. 444-52, 2011.

TREEDE, R. D.; MAGERL, W. Multiple mechanisms of secondary hyperalgesia. **Progress in Brain Research**, v. 129, p. 331-341, 2000.

TSUKAHARA, Y. et al. Phospholipase A<sub>2</sub> Mediates Nitric Oxide Production by Alveolar Macrophages and Acute Lung Injury in Pancreatitis. **Annals of Surgery**, v. 229, n. 3, p. 385-92, 1999.

TURKYLMAZ, S. et al. Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Pancreatitis in Rats. **Journal of Surgical Research**, v. 145, p. 19-24, 2008.

URUÑUELA, A. et al. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction.

**Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1588, p. 159-164, 2002.

VERA-PORTOCARRERO, L. P.; LU, Y.; WESTLUND, K. N. Nociception in persistent pancreatitis in rats: effects of morphine and neuropeptide alteration.

**Anesthesiology**, v. 98, p. 474-84, 2003.

VERA-PORTOCARRERO, L. P.; WESTLUND, K. N. Attenuation of nociception in a model of acute pancreatitis by an NK-1 antagonist. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 631-40, 2004.

VERA-PORTOCARRERO, L.; WESTLUND, K. N. Role of Neurogenic Inflammation in Pancreatitis and Pancreatic Pain. **Neurosignals**, v. 14, n. 4, p. 158-65, 2005.

VIVANCOS G.G., et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 37, p.391-399, 2004

WANG, G. et al. Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 12, p. 1427-1430, 2009.

WANG, L. et al. Effects of resveratrol on calcium regulation in rats with severe acute pancreatitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, p. 271-276, 2008.

WHITCOMB, D. C. Acute Pancreatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 20, p. 2142-50, 2006.

WINSTON, J. H. et al. Acute pancreatitis results in referred mechanical hypersensitivity and neuropeptide up-regulation that can be suppressed by the protein kinase inhibitor k252a. **Journal of Pain**, v. 4, n.6, p. 329-37, 2003.

WINSTON, J. H. et al. Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain. **Pain**, v. 117, p. 214-22, 2005.

YADAV, ; AGARWAL, ; PITCHUMONI, S. A Critical Evaluation of Laboratory Tests in Acute Pancreatitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 6, p. 1309-1318, 2002.

YOSHINAGA, K.; WASHIZUKA, M.; SEGAWA, Y. Fasting exacerbates acute pancreatitis by occlusion of the common bile duct in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 455-461, 2000.

YU, J. H. et al. Supression of cerulein induced cytokine expression by antioxidants in pancreatic acinar cells. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 1359-1368, 2002.

ZHANG, X. et al. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF- $\kappa$ B expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 4, p. 548-56, 2007.

ZHOU, M. et al. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: Mechanisms and potential intervention. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 17, p. 2094-9, 2010.

## ANEXO I

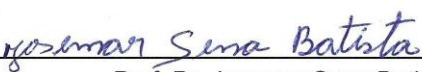


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

### **DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CAESALPININA PYRAMIDALIS NA PANCREATITE AGUDA EM RATOS.”** sob coordenação do **Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo** (protocolo **CEPA 28/2011**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 14/07/2011.

São Cristóvão, 14 de julho de 2011

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Josemar Sena Batista  
Vice-Presidente (em exercício) do CEPA/UFS

## ANEXO II

**De:** Journal of Ethnopharmacology <[jethnoph@chem.leiden.univ.nl](mailto:jethnoph@chem.leiden.univ.nl)>

**Para:** [enicamargo@yahoo.com.br](mailto:enicamargo@yahoo.com.br)

**Enviadas:** Sexta-feira, 30 de Setembro de 2011 16:25

**Assunto:** Submission Confirmation for your paper

Dear Dr. Camargo,

Your submission entitled "Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis**

Danielle G. Santana<sup>1</sup>, Cliomar A. Santos<sup>1</sup>, Alan D. C. Santos<sup>2</sup>, Paulo C. L. Nogueira<sup>2</sup>, Sara M. Thomazzi<sup>1</sup>, Charles S. Estevam<sup>1</sup>, Enilton A. Camargo<sup>1\*</sup>

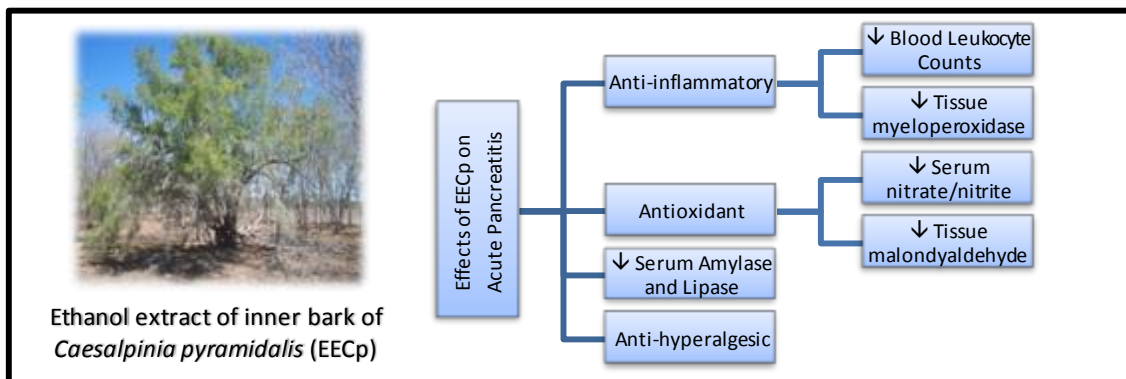
<sup>1</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe (UFS), São Cristóvão, 49100-000, SE, Brazil

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Federal University of Sergipe (UFS), São Cristóvão, 49100-000, SE, Brazil

\*Correspondence to:

E A Camargo; Tel: +55-79-2105-6644; Fax: +55-79-2105-6474; *E-mail address:* eniltoncamargo@ufs.br

## Graphical abstract



## Abstract

**Ethnopharmacological relevance:** *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) is a plant found in the Northeast of Brazil that is popularly used to treat inflammation. Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disease for which abdominal pain is a relevant symptom. As there is no specific therapy for AP, we have investigated the effect of the ethanol extract of the inner bark of *C. pyramidalis* (EECp) on the AP induced by common bile duct obstruction (CBDO) in rats.

**Material and Methods:** AP was induced in male Wistar rats (200-250 g, n = 6-8) through laparotomy and subsequent CBDO. Animals were euthanized after 6 (G6h) or 24 h (G24h) of induction. In the G6h protocol, animals were pretreated with EECp (100-400 mg/kg, p.o.) or vehicle (Tween 80; 0.2%) 1 h before CBDO or sham surgery. For the G24h protocol, rats were pretreated with EECp (400 mg/kg, 1 h before CBDO or 1 h before and 12 h after CBDO) or vehicle. The following parameters were measured: inflammatory/oxidative (myeloperoxidase activity and malondialdehyde formation in the pancreas and lung, leukocyte counts in the blood and serum nitrate/nitrite), enzymatic (serum amylase and lipase levels) and nociceptive (abdominal hyperalgesia).

**Results:** Induction of AP by CBDO significantly increased all the parameters evaluated in both G6h and G24h protocols, when compared with the respective sham group. In the G6h protocol, the EECp pretreatment (400 mg/kg) significantly reduced all these parameters, besides completely inhibiting abdominal hyperalgesia. The same profile of reduction was observed from two administrations of EECp in the G24h protocol, while one single dose of EECp was able to significantly reduce pancreatic MDA, serum lipase levels, leukocyte counts in the blood and abdominal hyperalgesia without affecting the other parameters. Furthermore, rutin was found in the EECp.

**Conclusions:** Our results demonstrated that EECp decreases inflammation, oxidative stress and hyperalgesia in CBDO-induced AP, making it of interest in future approaches to treat this condition.

**Keywords:**

*Caesalpinia pyramidalis*, ethanol extract, pancreatitis, abdominal hyperalgesia, inflammation, lipid peroxidation

**Abbreviations:**

ANOVA, analysis of variance; AP, acute pancreatitis; CBDO, common bile duct obstruction; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EECp, ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis*; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; NO, nitric oxide; NO<sub>x</sub><sup>-</sup>, nitrate/nitrite; SEM, standard error of mean; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances

## 1. Introduction

Acute pancreatitis is an inflammatory disease caused mainly by gallstones or abuse of alcohol (Wang et al., 2009). This disease has an incidence varying from 5 to 80 per 100,000 inhabitants (Abela and Carter, 2010) and a mortality rate that can reach 5%, depending on the severity (Pandol et al., 2007). The pathophysiology of acute pancreatitis is not completely understood and involves many events and mediators that, along with the rapid onset of this disease, frequently make the clinical management of acute pancreatitis complicated (Bang et al., 2008). Although the etiology of acute pancreatitis is still controversial, it is generally accepted that an important initial event is the activation of trypsinogen in the pancreatic acini (Frossard et al., 2008), followed by activation of other enzymes (e.g. elastase and phospholipase A<sub>2</sub>) and intrapancreatic inflammation caused by the production of chemokines and leukocyte recruitment, besides pancreatic edema (Bhatia et al., 2005). This process can spread out through the activated pancreatic enzymes and mediators that reach the circulation and consequently other tissues, leading to systemic inflammation (Bhatia, 2000; Al Mofleh, 2008; Dios, 2010).

Another key feature of acute pancreatitis is abdominal pain, which is one of the main complaints of patients (Ceyhan et al., 2008) and is perceived as an epigastric discomfort that can radiate to other regions (Vera-Portocarrero and Westlund, 2005; Frossard et al., 2008). This phenomenon may be related either to the increase of ductal pancreatic pressure or the inflammatory events such as neurogenic inflammation and oxidative stress (Liddle and Nathan, 2004; Vera-Portocarrero and Westlund, 2005; Van Esch et al., 2006).

The treatment of acute pancreatitis is still difficult and usually involves supportive therapy, prevention of infection, dissemination of the inflammatory process and pain relief (Bang et al., 2008). There is no specific pharmacological therapy for this condition and a great need for new alternatives to treat acute pancreatitis are undoubtedly of interest. Regarding this concern, natural products have been throughout the decades a source of substances with pharmacological potential, and in Brazil the “caatinga” ecosystem is largely known for its biodiversity (Desmarchelier et al., 1999; Alburquerque et al., 2007; Agra et al., 2008).

In this way, *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) is an endemic tree of the Northeast region of Brazil that is known popularly as “catingueira” (Silva and Matos, 1998). Parts of this plant, especially the inner bark or leaves, are traditionally used because of their anti-inflammatory, diuretic, dyspeptic, digestive, antipyretic, and expectorant effects (Silva and Matos, 1998; Mendes et al., 2000; Bahia et al., 2005; Agra et al., 2007). Several compounds have already been identified in the leaves or trunk of this plant. Mendes et al. (2000) identified two new phenolic compounds such as 4-O- $\beta$ -glucopyranosyloxy-(Z)-7-hydroxycinnamic and 4-O- $\beta$ -glucopyranosyloxy-(Z)-8-hydroxycinnamic acids, besides lupeol and agathisflavone, in the chloroformic fraction of the leaves of *C. pyramidalis*. Also, Bahia et al. (2005) isolated compounds such as caesalflavone (a new biflavonoid), podocarpusflavona A, apigenin and kaempferol in the chloroform extract of the leaves and 4,4'-dihydroxy-2'-methoxychalcone, syringaresinol and methyl gallate in the chloroform extract of the trunk wood of this plant. Recently, Bahia et al. (2010) identified agathisflavone and taxifolin and the minor biflavones such as loniflavone,

amentoflavone, 5'-hydroxyamentoflavone and podocarpusflavone A in the methanol extract of the leaves of *C. pyramidalis*.

A previous study has shown that the ethanol extract of the inner bark of this plant possesses anti-inflammatory and antinociceptive activities by using models as carrageenan-induced edema and peritonitis in rats and mice, respectively, as well as acetic acid-induced abdominal writhing and formalin-induced nociception in mice (Santos et al., 2011). These evidences suggest that *C. pyramidalis* has a potential in treating inflammatory and painful conditions of clinical relevance such as acute pancreatitis.

In this study, we aimed to investigate the effect of the ethanol extract of the inner bark of *C. pyramidalis* (EECp) in a model of acute pancreatitis in rats. Common bile duct obstruction (CBDO)-induced pancreatitis (Samuel et al., 1994) is widely used as an experimental model to mimic pancreatitis caused by lithiasis, the main cause of acute pancreatitis attacks in humans. The use of EECp as an anti-inflammatory in popular medicine, along with previous data confirming the anti-inflammatory and antinociceptive properties of this extract, gives basis to this hypothesis.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Drugs and Reagents**

Rutin, apigenin, quercetin, baicalein, hexadecyltrimethylammonium bromide, o-dianisidine hydrochloride, nitrate reductase and cofactors, Griess reagent and

Türk solution were purchased from Sigma (USA). Morphine and diazepam were obtained from União Química (Brazil), and isoflurane was obtained from (Isoforine<sup>®</sup> - Cristália, Itapira, SP, Brazil). Other reagents were obtained from Merck.

## **2.2. Plant material and preparation of the inner bark ethanol extract**

The inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* was collected at the Xingó Village, Canindé de São Francisco, Sergipe State, Brazil (09°66'00" S, 37°78'94" W). A specimen was identified by the botanist Dr. Ana Paula Nascimento Prata, Department of Biology at the Federal University of Sergipe, and deposited in the Herbarium of this institution (Marechal Rondon Av., São Cristóvão, Sergipe, 49100-000, Brazil) under the registration number ASE 13,164. The inner bark was dried at 40°C with forced air for 2 days and subsequently powdered (2,840 g) and extracted by maceration at room temperature with 90% ethanol for 5 days. The extract was filtered in vacuum, and the solvent was removed using a rotary evaporator (45°C). The percentage of EECp yield was 2.6% (73.8 g).

## **2.3. High performance liquid chromatography-diode array detection analysis**

High performance liquid chromatography was performed with a Shimadzu Liquid Chromatograph (Prominence model, Kyoto, Japan) consisting of a vacuum degasser DGU-20A3 model, SIL-10A autosampler, two high pressure pumps LC-6A, and an SPDM20Avp photodiode array detector system coupled

with a CBM 20A interface. Data collection was carried out using LC Solution software. Analysis was performed in an analytical Phenomenex LUNA® C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm of particle diameter, Torrance, CA, USA). Separation of compounds was done by reverse mode gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the volume injected was 20 µL, and a mobile phase consisting of 0.5% aqueous formic acid (v/v, A) and acetonitrile (B) was used in the following proportion: 30-63.3% (B) for 30 min, 40-100% for 5 min and 100% for 5 min. The photodiode array detector was set at 254 nm for acquiring the chromatograms.

Samples of EECp or standards (rutin, apigenin, quercetin or baicalein) were dissolved in methanol at concentrations of 5 and 0.1 mg/mL, respectively, and submitted to filtration through a cellulose membrane (pore diameter of 0.45 µm).

## **2.4. Animals**

Male Wistar rats (220-270 g) were obtained from the Animal Center of the Federal University of Sergipe. Animals were maintained at  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$  with free access to food (Purina®) and filtered water under a 12:12 h light/dark cycle. The animals were deprived of food for 8 h before the experiment, but had free access to water. All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee for Animal Use in Research at the Federal University of Sergipe (protocol numbers 06/10 and 28/11), which was conducted in accordance with the internationally accepted principles for

laboratory animal use and care. At the conclusion of the experiments, animals were euthanized by overdose of isoflurane followed by exsanguination.

## **2.5. Experimental Procedure**

Under anesthesia by inhalatory isoflurane (2-3%), acute pancreatitis was induced by common bile duct obstruction (CBDO), as previously described by Samuel et al. (1994). This consisted of a midline laparotomy through which the pancreas was exteriorized by the duodenal loop in order to perform the common bile duct ligation. For this purpose, two suture threads were wrapped around the common bile duct, which was sutured in two positions with a distance of at least 0.5 cm between them, followed by a small incision to assure that the duct flow was obstructed. Concomitantly, groups of animals underwent anesthesia, laparotomy and exteriorization of the pancreas without obstruction of the common bile duct as an experimental control (sham group). The animals were euthanized after 6 or 24 h of the CBDO, depending on the experimental protocol.

## **2.6. Experimental Design**

Nine experimental groups were used in this study. In the 6 h protocol, 5 groups were considered: the group pretreated with vehicle (0.2% Tween 80 in NaCl 0.9%, 10 mL/kg, p.o.) 1 h before undergoing only laparotomy and duct exposure (vehicle + sham group; n = 6); the group pretreated with vehicle (1 h before) and submitted to CBDO (vehicle + CBDO group; n = 8); and three groups that

were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.) and submitted to CBDO (EECp + CBDO groups; n = 8 each).

In the 24 h protocol, the animals were divided into 4 groups, as follows. (i) vehicle + sham group: animals were pretreated with vehicle (1 h before), submitted to laparotomy without duct obstruction, and then received another administration of vehicle (12 h after, p.o.; n = 6); (ii) vehicle + CBDO group: animals were pretreated with vehicle (1 h before, p.o.), submitted to CBDO, and then received another administration of vehicle (12 h after, p.o.; n = 8); (iii) EECp (1 dose) + CBDO group: animals were pretreated with EECp (400 mg/kg, 1 h before, p.o.), submitted to CBDO, and subsequently administered vehicle (12 h after, p.o.; n = 6); and (iv) EECp (2 doses) + CBDO group: animals were pretreated with EECp (400 mg/kg, 1 h before, p.o.), submitted to CBDO, and subsequently administered EECp again (400 mg/kg, 12 h after, p.o.; n = 6). In these experiments, all rats were euthanized 24 h after CBDO.

An additional group treated with morphine was considered in the 24 h protocol, only for the measurement of abdominal hyperalgesia (positive control). This group (n = 6) received morphine at 5 mg/kg, i.p., 30 min before each measurement performed at 6, 12 and 24 h (Vera-Portocarrero et al., 2003).

After 6 or 24 h intervals, the animals were euthanized and samples of pancreas, lung, liver and kidney were stored at -20°C. After collection, the blood was centrifuged at 1,000xg for 15 min at 4°C to separate plasma that was then stored at -20°C.

## **2.7. Measurement of Abdominal Hyperalgesia**

To evaluate the mechanical hyperalgesia in the rat abdominal region, we used the electronic von Frey (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil), according to previous description (Camargo et al., 2011). The animals were transferred to individual cages and acclimatized over 3 days by spending 30 min each day. On the day of the test, mechanical stimuli were applied to the anterior-lateral region of the abdomen of the animals, in triplicate, prior to any manipulation and immediately before euthanasia for the 6 h protocol or after 6, 12 or 24 h of CBDO for the 24 h protocol. At each time point, an increasing stimulus (in g) was applied to the abdominal region of the rats, with an interval of at least 1 min, until any withdrawal behavior was observed, at which time the threshold force value in the equipment was registered. The test was performed “blind”. Data were expressed as variation ( $\Delta$ ) by subtracting the mean obtained from the three measurements, taken at the referred to time point after pancreatitis induction, from the mean basal value recorded for each animal (prior to pancreatitis).

## **2.8. Determination of biochemical and inflammatory parameters**

For myeloperoxidase activity (MPO) determination, pancreas and lung samples were collected, weighed and homogenized with potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0 containing 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide), and 1-mL aliquots of the homogenates were centrifuged (2 min, 8,000xg, 4°C). In a 96-well plate, aliquots of supernatant were incubated with a solution of o-dianisidine hydrochloride (0.167 mg/mL containing 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The MPO activity was measured kinetically in a microliter plate scanner (Labsystem

Multiskan) at 460 nm and intervals of 15 s over a period of 5 min. Results were expressed as units of MPO per mg tissue (UMPO/mg tissue). An UMPO was considered as the amount of enzyme that degrades 1 mmol of hydrogen peroxide/min (Bradley et al., 1982).

For determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), samples of pancreas, lung, liver and kidney were weighed and homogenized in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) containing butylated hydroxytoluene (12.6 mM). Then, aliquots of the homogenate (in duplicate) were incubated (90°C, 45 min) with thiobarbituric acid (0.37%) in an acidic solution (trichloroacetic acid at 15% and hydrochloric acid at 0.25 N). At the end of incubation, the homogenates were centrifuged (5 min, 8,000xg), and aliquots from the supernatants were extracted with n-butanol, followed by stirring in a vortex for 30 s and further centrifugation (2 min, 8,000xg). The supernatant absorbance was measured at 535 nm in a microplate reader (corrected by the values of absorbance at 572 nm). The results were calculated using a molar extinction coefficient of  $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) formed per mg of tissue (Bose et al., 1989).

The levels of amylase and lipase in serum were assessed for each experimental group by using specific commercial kits for kinetic determination of amylase (Katal Biotechnology, Belo Horizonte, MG, Brazil) and a colorimetric kit for determination of lipase (Human do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

The edema index was calculated as the ratio of wet weight and dry weight of the samples of pancreatic tissue. For this purpose, the samples were dried at 90°C for 12 h, and tissue weight was measured before and after this procedure.

Total and differential leukocyte counts were performed in aliquots of 20 µL of peripheral blood taken from the tail vein of anesthetized rats immediately before euthanasia. The total leukocyte count was performed in a Neubauer chamber, and the differential count was conducted under a light microscope with immersion oil objective in cytocentrifuged smears colored with Giemsa Newprov<sup>®</sup>, where 100 cells per slide were counted, based on normal morphological criteria. Results were expressed as number of leukocytes/mL of peripheral blood.

Total nitrate/nitrite (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) concentration was determined in serum submitted to ultrafiltration (10 kDa; Microcon centrifugal filter units) using the Griess reaction for nitrite, after the nitrate reductase-catalyzed reduction of nitrate to nitrite, according to Grisham et al. (1996).

## **2.9. Spontaneous locomotor activity**

Rats were orally treated with vehicle or EECp (400 mg/kg) 1 h before, or diazepam (1.5 mg/kg, i.p.) 30 min before, they were introduced to the open field apparatus. The spontaneous locomotor activity of the animals was assessed in a circular open field 60 cm in diameter, over a period of 4 min (Capaz et al., 1981). This procedure was repeated 6 h after the first measurement, and the values were expressed as the number of field crossings during the 4 min.

## 2.10. Statistical Analysis

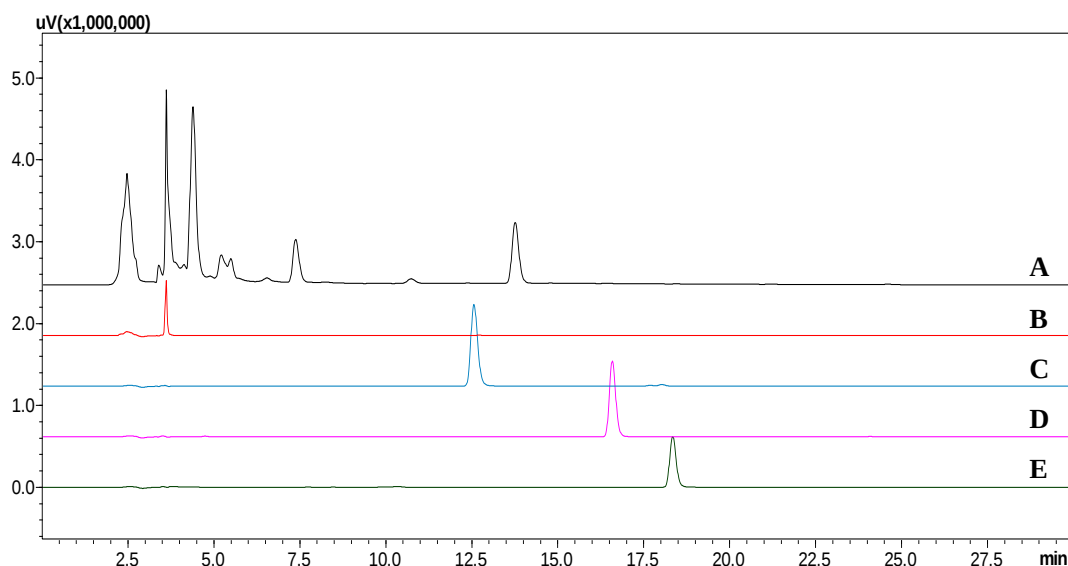
Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test by using GraphPad Prism software (version 4.0). In the time course data for abdominal hyperalgesia (Fig. 5 B), two-way ANOVA was used to compare the groups and treatments over all times, and if a significant time vs. treatment interaction was found, one-way ANOVA followed by Tukey's test was performed for each time to distinguish the effect of the specific treatment.  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. HPLC chromatographic analysis of EECp

EECp was submitted to HPLC chromatographic analysis for the presence of flavonoids because of the description in the literature of high quantities of flavonoids in the inner bark and/or leaves of this plant (Silva et al., 2011). Figure 1 shows a typical HPLC chromatogram presenting at least 5 important peaks. The presence of rutin, apigenin, baicalein and quercetin was investigated by comparing the retention time of EECp and the flavonoids' standard solutions, but only the retention time of the rutin standard matched with one peak found in the EECp (Fig. 1, line B). This was confirmed by the fortification of the EECp with rutin and the subsequent analysis, which showed a superposition of the

retention times of the peaks (not shown), indicating that rutin is present in the EECp.



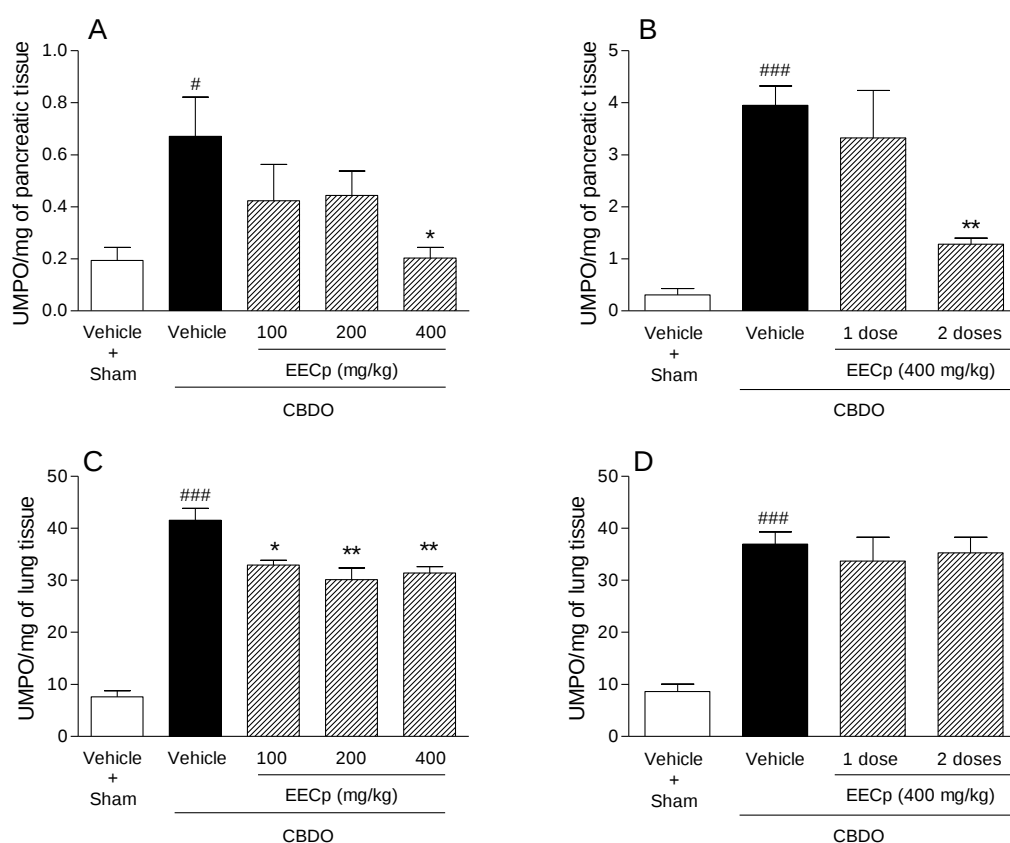
**Figure 1:** Chromatograms of the ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (A) and authentic standard solution of rutin (B), quercetin (C), apigenin (D) and baicalein (E) subjected to high performance liquid chromatography-diode array detection analysis set at 254 nm.

### 3.2. Effect of EECp on MPO activity in pancreatic and lung tissue

The CBDO-induced pancreatic inflammation was characterized by a marked increase of pancreatic MPO activity after 6 ( $p<0.05$ ) or 24 h ( $p<0.001$ ), when compared with the respective sham groups (Fig. 2A and B). The previous treatment with EECp at 400 mg/kg reverted this effect ( $p<0.05$ ) after 6 h of obstruction, which was not observed at lower concentrations of this extract, when compared with animals pretreated with vehicle (Fig. 2A). Also, two administrations of EECp (-1 and 12 h) significantly reduced ( $p<0.01$ ) the

pancreatic MPO activity after 24 h of induction. Single pretreatment with EECp (-1 h) did not modify this activity (Fig. 2B).

The induction of pancreatitis also significantly increased MPO activity in the lung tissue at both 6 and 24 h ( $p < 0.001$ ), when compared with the respective sham groups (Fig. 2C and D). After 6 h of obstruction, the pretreatment with EECp (-1 h), at doses varying from 100 to 400 mg/kg, significantly reduced the lung MPO activity (Fig. 2C). Neither one nor two administrations of EECp were able to alter the MPO activity in lung tissue after 24 h of the induction of pancreatitis (Fig. 2D).



**Figure 2:** Effect of the ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) on pancreatic and lung myeloperoxidase (MPO) activity. In

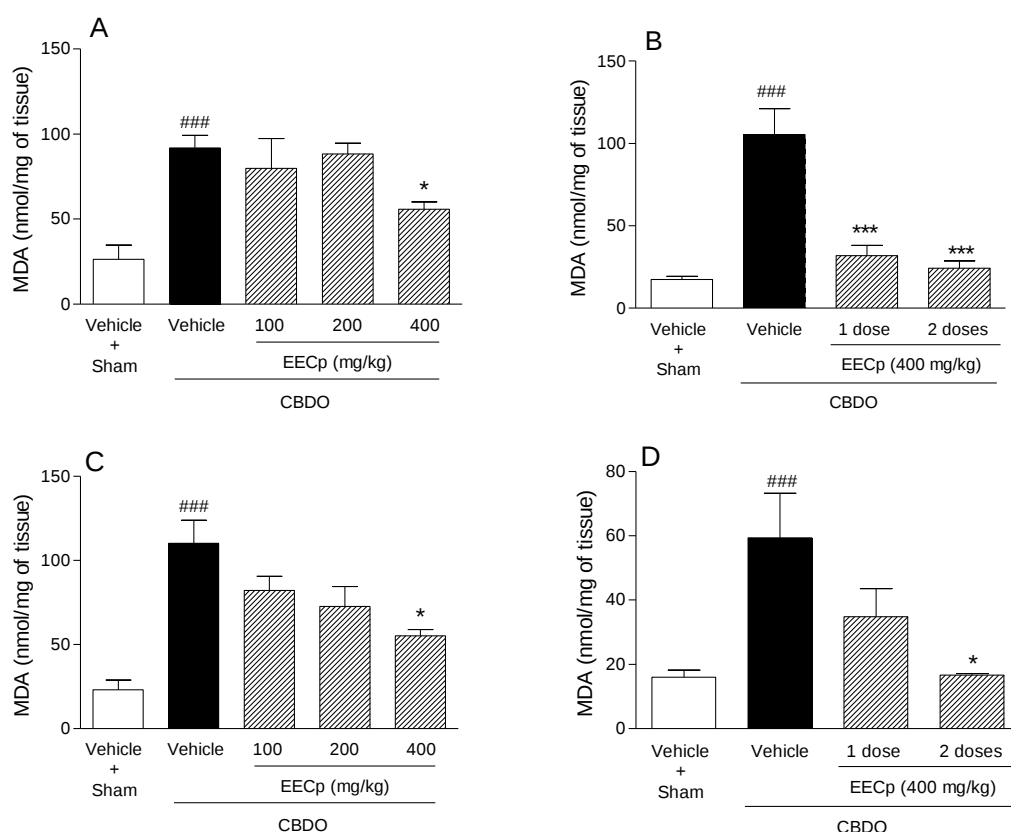
panels A and C, rats were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg; -1 h) or vehicle, submitted to common bile duct obstruction (CBDO) or sham surgery, and sacrificed 6 h after the obstruction. In panels B and D, EECp (400 mg/kg) was administrated to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp, they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. MPO activity was measured in the pancreatic (A and B) and lung (C and D) tissues (n = 6-8 rats). <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01 or <sup>###</sup>p<0.001 vs. vehicle + sham; \*p<0.05 or \*\*p<0.01 vs. vehicle + CBDO (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

### **3.3. Effect of EECp on pancreatic edema**

There was no significant alteration of pancreatic edema after 6 h of vehicle treatment plus CBDO ( $4.6 \pm 0.3$ ), when compared with the sham group ( $3.7 \pm 0.3$ ), and this was not modified by the previous treatment with any dose of EECp used ( $3.8 \pm 0.3$ ,  $3.9 \pm 0.4$  and  $4.6 \pm 0.1$  for 100, 200 and 400 mg/kg, respectively). In contrast, after 24 h of the induction of pancreatitis, a significant increase in pancreatic edema was observed ( $5.9 \pm 0.2$ , p<0.01), when compared with the sham group ( $4.4 \pm 0.2$ ), which was reduced by two administrations of EECp at 400 mg/kg ( $4.5 \pm 0.1$ , p<0.01), but not by one single administration of this extract ( $5.1 \pm 0.2$ ).

### **3.4. Effect of EECp on TBARS formation**

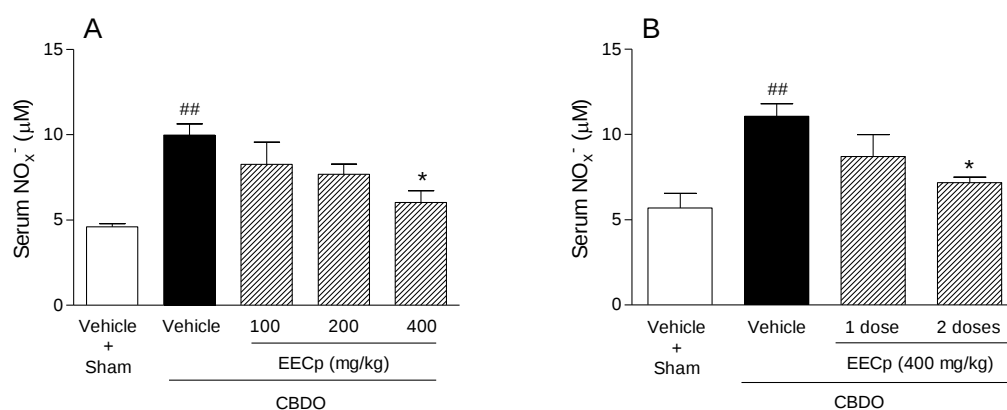
Besides the increase in MPO activity, CBDO also induced lipid peroxidation, detected through the increase of the formation of MDA in both pancreas and lung tissues after 6 ( $p < 0.01$  each) or 24 h ( $p < 0.01$  and  $p < 0.01$ , respectively; Fig. 3), when compared with the respective sham groups. The administration of EECp (400 mg/kg) significantly decreased MDA formation in both the pancreas and lung tissues ( $p < 0.05$ ) after 6 h of CBDO, when compared with the vehicle-treated group (Fig. 3A and B). After 24 h of CBDO, both the one- and two-treatment schemes with EECp (400 mg/kg) diminished MDA formation in the pancreatic tissue ( $p < 0.0001$ ; Fig. 3C); however, MDA formation was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) in lung tissue only after two administrations of EECp (400 mg/kg; Fig. 3D), when compared with the vehicle-treated group. MDA formation in the liver and kidney was also investigated as a marker of oxidative injury in these tissues. Neither the CBDO induction nor the administration of EECp at any dose or scheme of treatment used altered the MDA formation in these tissues (data not shown).



**Figure 3:** The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) decreases malondialdehyde (MDA) formation in the pancreatic and lung tissues of animals with common bile duct obstruction (CBDO)-induced pancreatitis. In panels A and C, rats were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg; -1 h) or vehicle, submitted to CBDO or sham surgery, and sacrificed 6 h after the obstruction. In panels B and D, EECp (400 mg/kg) was administrated to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp, they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. MDA formation was measured in the pancreatic (A and B) and lung (C and D) tissues for  $n = 6-8$  rats. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  or ### $p < 0.001$  vs. vehicle + sham; \* $p < 0.05$  or \*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle + CBDO (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

### 3.5. Effect of EECp on serum $\text{NO}_x^-$ concentration

Total serum  $\text{NO}_x^-$  concentration was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in animals that were submitted to CBDO in the 6 h protocol, when compared with the sham group. The pretreatment with EECp at 400 mg/kg, but not at lower doses, significantly decreased this effect ( $p < 0.05$  vs. the vehicle-treated group; Fig. 4A). Twenty-four h after CBDO, the serum  $\text{NO}_x^-$  concentration was also increased in animals with pancreatitis ( $p < 0.05$  vs. the sham group), which was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) by the treatment with two doses of EECp, but not with one single treatment (Fig. 4B).



**Figure 4:** The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) reduces total nitrate/nitrite ( $\text{NO}_x^-$ ) concentration during common bile duct obstruction (CBDO)-induced pancreatitis. In panel A, rats were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg; -1 h) or vehicle, submitted to CBDO or sham surgery, and sacrificed 6 h after the obstruction. In panel B, EECp (400 mg/kg) was administrated to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp,

they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  or ### $p < 0.001$  vs. vehicle + sham; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  or \*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle + CBDO (one-way ANOVA followed by Tukey's test);  $n = 6-8$ .

### 3.6. Effect of EECp on circulating leukocyte counts

Associated with the induction of pancreatitis and investigation of pancreatic and lung effects, the total and differential leukocyte counts in the peripheral blood were evaluated as an additional marker of systemic inflammation. In the experiments performed 6 h after CBDO, we found a clear elevation of total leukocyte counts ( $p < 0.001$ ), which was caused by either increases in the polymorphonuclear cell number (mostly neutrophils,  $p < 0.001$ ) or in the mononuclear cell number (monocytes and lymphocytes,  $p < 0.001$ ), when compared with the respective sham group, as shown in Table 1. All doses of EECp (100-400 mg/kg) used in the experiments of 6 h after CBDO, as well as any scheme of treatment (one or two administrations) used in the experiments of 24 h of CBDO, reduced the total and differential leukocyte counts ( $p < 0.001$ ; Table 1), when compared with the respective vehicle-treated group.

**Table 1: The ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) reduces the total and differential leukocyte counts in the peripheral blood of rats submitted to common bile duct obstruction (CBDO)-induced acute pancreatitis.**

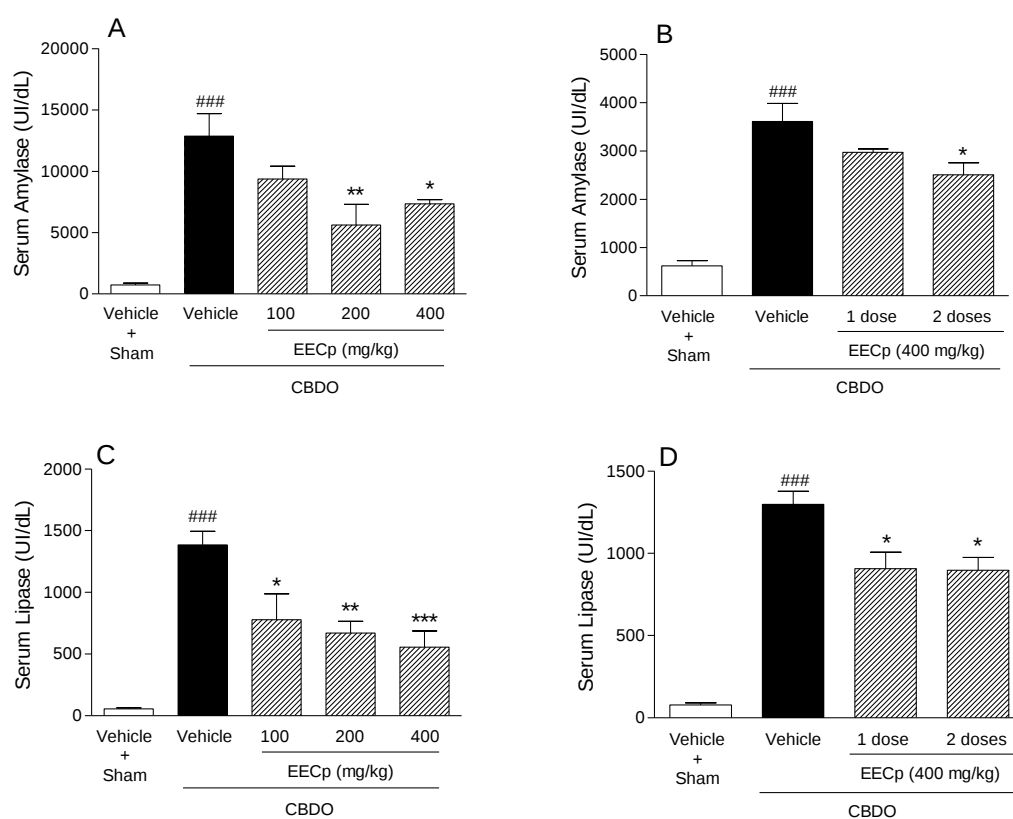
|      | Treatment                        | Total leukocyte<br>( $\times 10^6/\text{mL}$ ) | Polymorphonuclear<br>cells ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) | Mononuclear cells<br>( $\times 10^6/\text{mL}$ ) |
|------|----------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 6 h  | Sham + Vehicle                   | $1.3 \pm 0.5$                                  | $0.7 \pm 0.3$                                          | $0.6 \pm 0.2$                                    |
|      | CBDO + Vehicle                   | $6.8 \pm 0.1^a$                                | $4.9 \pm 0.3^a$                                        | $1.9 \pm 0.3^a$                                  |
|      | CBDO + EECp (100 mg/kg)          | $2.3 \pm 0.1^b$                                | $0.5 \pm 0.1^b$                                        | $0.8 \pm 0.1^b$                                  |
|      | CBDO + EECp (200 mg/kg)          | $2.5 \pm 0.1^b$                                | $1.6 \pm 0.1^b$                                        | $0.9 \pm 0.1^b$                                  |
|      | CBDO + EECp (400 mg/kg)          | $2.6 \pm 0.2^b$                                | $1.7 \pm 0.3^b$                                        | $0.9 \pm 0.2^b$                                  |
| 24 h | Sham + Vehicle                   | $2.6 \pm 0.4$                                  | $1.5 \pm 0.5$                                          | $1.1 \pm 0.1$                                    |
|      | CBDO + Vehicle                   | $0.3 \pm 0.8^a$                                | $4.8 \pm 0.6^a$                                        | $5.5 \pm 1.3^a$                                  |
|      | CBDO + EECp (400 mg/kg, 1 dose)  | $6.0 \pm 1.9^b$                                | $3.6 \pm 1.4^b$                                        | $2.4 \pm 0.6^b$                                  |
|      | CBDO + EECp (400 mg/kg, 2 doses) | $5.1 \pm 1.1^b$                                | $2.5 \pm 0.4^b$                                        | $2.6 \pm 0.8^b$                                  |

Experiments were performed in 6 or 24 h intervals of induction. In the 6 h interval, groups of animals were treated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg) or vehicle (Tween 80, 0.2% in saline) 1 h before they were submitted to CBDO or sham surgery and sacrificed 6 h after the obstruction. In the 24 h interval, EECp (400 mg/kg) was administrated to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp, they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. Data are mean  $\pm$  SEM for  $n = 6-8$ ; one-way ANOVA followed by Tukey's post test.  $^a p < 0.001$  vs. the respective sham + vehicle group or  $^b p < 0.001$  vs. the respective CBDO + vehicle group.

### 3.7. Effect of EECp on serum amylase and lipase concentrations

As expected, the levels of serum amylase and lipase concentrations were augmented after 6 h ( $p < 0.001$  each) or 24 h ( $p < 0.001$  each) of the CBDO, when compared with the sham group (Fig. 5). Previous administration of EECp at 200

or 400 mg/kg, but not at 100 mg/kg, significantly decreased the serum amylase ( $p < 0.05$  each) after 6 h of CBDO, when compared with the vehicle group (Fig. 5A). In these same groups of animals, EECp (100-400 mg/kg) also significantly reduced the serum lipase ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$  for 100, 200 or 400 mg/kg, respectively; Fig. 5B). Twenty-four h after the CBDO, the previous treatment with 400 mg/kg of EECp did not alter amylase levels, but significantly reduced levels of lipase ( $p < 0.001$ ), when compared with the vehicle-treated group. In addition, two administrations of EECp significantly reduced both serum amylase ( $p < 0.05$ ) and lipase ( $p < 0.001$ ) levels, when compared with the respective vehicle-treated group (Fig. 5C and D).



**Figure 5:** The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) reduces serum amylase (A and B) and lipase (C and D) concentrations during common bile duct obstruction (CBDO)-induced pancreatitis. In panels A and C, rats were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg; -1 h) or vehicle, submitted to CBDO or sham surgery, and sacrificed 6 h after the obstruction. In panels B and D, EECp (400 mg/kg) was administered to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp, they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. <sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01 or <sup>###</sup>p<0.001 vs. vehicle + sham; \*p<0.05, \*\*p<0.01 or \*\*\*p<0.001 vs. vehicle + CBDO (one-way ANOVA followed by Tukey's test); n = 6-8.

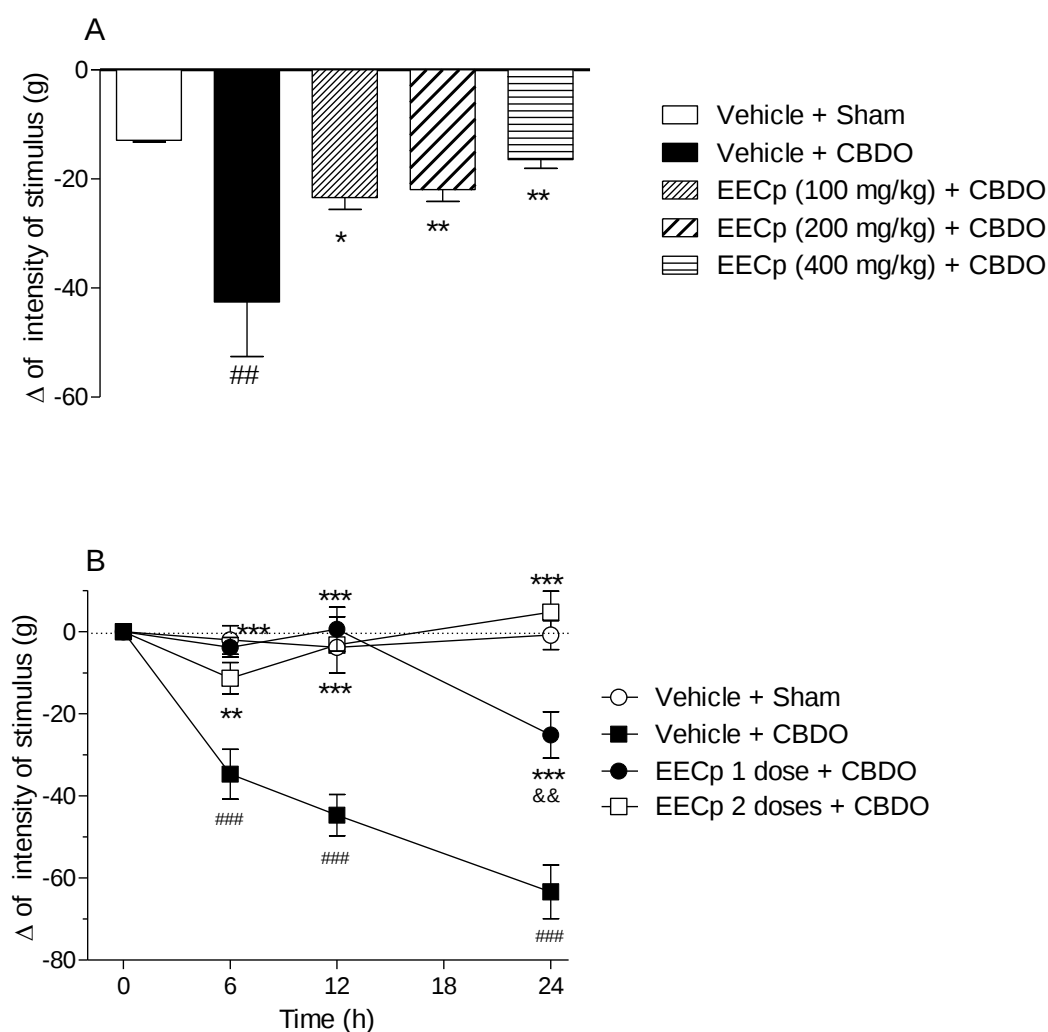
### 3.8. Effect of EECp on mechanical abdominal hyperalgesia

CBDO also induced a marked abdominal hyperalgesia in rats (Fig. 6) that was detected through the decreased intensity of stimulus needed to cause a withdrawal behavior in the rats after 6 (p<0.01), 12 (p<0.001) or 24 h, when compared with the respective sham group. Two-way ANOVA indicated a significant interaction between the time and treatment in this experiment (p<0.001; F = 10.91). The sham procedure did not alter the withdrawal behavior of the rats (Fig. 6B).

Figure 6A demonstrated that pretreatment with EECp clearly reduced the abdominal hyperalgesia of rats submitted to CBDO at 100 (p<0.05), 200 or 400 mg/kg (p<0.01) after 6 h of induction, when compared with the sham group. The experiments performed at 24 h after CBDO have shown that a single previous

treatment of animals with EECp (400 mg/kg) maintained complete reduction of abdominal hyperalgesia for the following 12 h ( $p < 0.001$  at each time evaluated, Fig. 5B), when compared with the vehicle-treated group. Twenty-four h after CBDO, animals pretreated with this single dose of EECp still presented a significant reduction in hyperalgesia, although the variation of the intensity of stimulus was significantly different from the sham group ( $p < 0.001$ ). The administration of the second dose of EECp (400 mg/kg) after 12 h of CBDO completely reduced the variation of intensity of stimulus applied to the abdominal region ( $p < 0.001$ , when compared with the groups that received only vehicle or  $p < 0.01$  when compared with the group that received the single dose of EECp 1 h before CBDO).

As expected, morphine treatment inhibited the  $\Delta$  of intensity of stimulus at 6 ( $13 \pm 1$  g;  $p < 0.001$ ), 12 ( $14 \pm 7$  g;  $p < 0.001$ ) and 24 h ( $-8 \pm 6$  g;  $p < 0.001$ ) after CBDO, when compared with animals treated with vehicle ( $-35 \pm 6$ ,  $-45 \pm 5$  and  $-63 \pm 6$  g, respectively, for 6, 12 and 24 h after CBDO).



**Figure 6:** The ethanol extract of the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* (EECp) inhibits abdominal hyperalgesia in common bile duct obstruction (CBDO)-induced pancreatitis in rats. In panel A, rats were pretreated with EECp (100, 200 or 400 mg/kg; -1 h) or vehicle (Tween 80, 0.2% in saline), submitted to CBDO or sham surgery, and sacrificed 6 h after the obstruction. In panel B, EECp (400 mg/kg) was administrated to rats only 1 h before (1 dose) CBDO or 1 h before and 12 h after (2 doses) CBDO. In this case, when rats did not receive EECp, they were given vehicle instead. Rats were sacrificed 24 h after the obstruction. The threshold forces to cause withdrawal behavior were

measured before (-1 h) and at 6 h (panel A) or at 6, 12 and 24 h (panel B), and the data was expressed as the variation observed (g) for the intensity of stimulus for  $n = 6-8$ .  $^{##}p < 0.01$  or  $^{###}p < 0.001$  vs. the respective vehicle + sham;  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$  or  $^{***}p < 0.001$  vs. the respective vehicle + CBDO. Panel A: one-way ANOVA followed by Tukey's test; Panel B: two-way ANOVA ( $p < 0.001$  and  $F = 10.91$ ) and one-way ANOVA followed by Tukey's test.

### **3.9. Lack of effect of EECp on the locomotor activity of rats**

After 1 h of the oral treatment of rats with EECp (400 mg/kg), there was no change in the number of crossings in the open field apparatus ( $29.0 \pm 3.3$ ), when compared with the vehicle-treated group ( $32.8 \pm 0.9$ ). In the same way, after 7 h of EECp administration, this extract did not alter the number of crossings ( $16.8 \pm 1.7$ ), when compared with the vehicle-treated group ( $21.7 \pm 4.9$ ). In contrast, the treatment of animals with diazepam (1.5 mg/kg) significantly decreased the number of field crossings by the animals after 30 min ( $12.0 \pm 3.5$ ;  $p < 0.001$ ) or 7 h ( $3.0 \pm 1.5$ ;  $p < 0.01$ ), when compared with the groups treated with vehicle at 1 h or 7 h after, respectively.

## **4. Discussion**

Treating acute pancreatitis is still a challenge to clinical management because this disease is of rapid onset, the pancreas is relatively inaccessible to physical examination, and in many cases systemic inflammation adds complications to

the patient's health (Pandol et al., 2007). The pharmacological treatment of this disease requires new options in order to be improved, especially for preventing systemic inflammation and treating abdominal pain that are important characteristics of pancreatitis (Ceyhan et al., 2008). It is worthwhile mentioning that even in experimental studies there is no drug that is designed to be an adequate positive control, particularly for the local and systemic inflammatory parameters of pancreatitis.

In this way, the ethnopharmacological knowledge can be useful in guiding the search for new compounds to treat pancreatitis. In this study, we have investigated the effect of the ethanol extract of a plant derived from the Brazilian "caatinga" ecosystem. Parts of *C. pyramidalis* are usually utilized by the population as a decoct to treat various non-specific inflammatory conditions (Silva and Matos, 1998; Mendes et al., 2000; Bahia et al., 2005; Agra et al., 2007), and the pharmacological validation of this use has been published elsewhere (Santos et al., 2011). The results obtained in the present study further confirm its traditional use by indicating that EECp exerts important modulatory effects on acute pancreatitis in rats, indicating an innovative value for this extract and enabling future studies on its components' activities.

In this study, CBDO was chosen as the model to induce pancreatitis in rats because it mimics the pancreatitis induced in humans by lithiasis, which is the main etiologic factor of this disease (Meyerholz et al., 2008; Samuel et al., 2005). Thus, by using CBDO-induced pancreatitis, many signs commonly observed in patients can be investigated. In this study, pancreatitis induced by CBDO was characterized by increased levels of pancreatic enzymes in the

blood, abdominal hyperalgesia, and pancreatic neutrophil infiltration, edema and lipid peroxidation. Two experimental sets were used to investigate the effects of EECp in the early (6 h) or late (24 h) periods after induction of pancreatitis. This is justified based on the fact that in this model of pancreatitis the source of the injury is induced surgically and is not reversible, which makes the local injury and systemic complications worse at latter times. After preliminary experiments, it was found that a single previous administration of EECp could be enough to reduce some of the inflammatory/nociceptive parameters after 6 h of CBDO. After performing the dose-response curve, the dose of 400 mg/kg was selected to carry out the 24 h interval experiments. In these experiments, both a single previous treatment (-1 h) and a previous treatment followed by another after 12 h of induction were compared for analyzing the inflammatory and nociceptive signs.

One of the hallmarks of pancreatitis is the elevation of amylase and/or lipase in the blood (Forsmark and Baillie, 2007). In the present study, CBDO increased both amylase and lipase levels after 6 or 24 h of induction, which is in agreement with other studies (Hirata et al., 2002; Barret et al., 2008). It is interesting that, while concentrations of amylase were lower at 24 h than at 6 h, the concentrations of lipase were maintained high throughout both time periods considered. Treatment with EECp was able to reduce both serum amylase and lipase after 6 or 24 h of induction. It is interesting to note that in the early pancreatitis (6 h) all doses of EECp used were capable of reducing lipase, but only higher doses of EECp decreased the amylase levels. Likewise, in the late experiments (24 h) both the one and two administration schemes of EECp significantly reduced lipase levels, although only two administrations of EECp

were able to reduce amylase levels. These results suggest that lipase levels were more susceptible to reduction by EECp than amylase levels, which may involve different kinetics of liberation and clearance of these enzymes in pancreatitis (Frossard et al., 2008), as the elevation of amylase levels generally appears first when compared to lipase levels.

As a consequence of pancreatic enzyme activation in the acini, local inflammatory response is developed, whose characteristics include edema and neutrophil infiltration. In the present study, the effect of EECp on these two indicators of inflammation was assessed. The MPO activity was increased in pancreatic tissue after 6 or 24 h of pancreatitis induction. This activity is a common marker of neutrophil infiltration into the tissues, as MPO is an enzyme found in the azurophilic granules of neutrophils. The dose of 400 mg/kg of EECp, but not the lower doses, decreased this activity after 6 h of CBDO; also, two doses, but not one single administration, of EECp reduced the MPO activity after 24 h of CBDO. This finding is consistent with the decrease of neutrophil infiltration and the anti-inflammatory effect of EECp. In addition, pancreatic edema was detected only at the latter time point used, but treatment with EECp did not modify this effect.

Lung injury is the main secondary complication of acute pancreatitis and the primary cause of death in patients (McKay and Butter, 2003; Wang et al., 2009; Zhou et al., 2010). Animals submitted to CBDO showed a higher neutrophil infiltration than sham group animals after 6 h of the induction, which was partially decreased by EECp at all doses used in this study. However, after 24 h of CBDO, neutrophil infiltration was still elevated and neither one single nor two

administrations of EECp were enough to reduce this systemic effect of pancreatitis. There is no reasonable explanation for this fact, but we must take into consideration that the pancreatic lesion is severe and persistent in this model. This fact substantially elevated the levels of pancreatic enzymes evaluated (and possibly increased the levels of other enzymes like tripsin, phospholipase A<sub>2</sub> and elastase, which are believed to trigger lung injury (Al Mofleh, 2008). As the effect of EECp on the levels of amylase and lipase was less effective after 24 h than that detected after 6 h of CBDO, it is possible to speculate on an association between these two observations. Even though there are these considerations, the results clearly demonstrated that EECp reduces pancreatic neutrophil infiltration, which may be of value for the treatment of pancreatitis.

Besides these results, it was also demonstrated that the leukocytosis induced by CBDO was reduced by the treatment with EECp at all doses (100-400 mg/kg) and schemes of treatment (one or two administrations) used here. The increase of total leukocyte counts in the peripheral blood was used as a general sign of systemic inflammation and was caused by the increases in both polymorphonuclear and mononuclear cells, as previously observed by others (Dios et al., 2002; Yubero et al., 2009; Ramudo et al., 2010). Treatment with EECp decreased all these alterations to the same extent that it reduced total leukocyte counts, confirming the potential of EECp to decrease leukocyte recruitment.

This potential was recently described in a study by Santos et al. (2011). These authors reported that the previous treatment of rats with EECp decreased paw

edema and MPO activity induced by subplantar injection of carrageenan. Also, they found that EECp reduced leukocyte recruitment to the mouse peritoneal cavity induced by carrageenan. These findings are in accordance with the data from the present study, in the model of CBDO-induced pancreatitis in rats. The main difference between our study and the study by Santos et al. (2011) is the fact that pancreatitis can cause systemic inflammation that resembles the condition observed in humans, which brings a higher clinical value to the effect observed.

In the study by Santos et al. (2011), the authors suggested that the anti-inflammatory effects of EECp could be related to the *in vitro* antioxidant activity of this extract. In our study, this was also taken into consideration, and the effect of EECp on *in vivo* lipid peroxidation was investigated. Lipoperoxidation is generally accepted as a catalytic degradation process caused by free radicals that affect the integrity of the poly-unsaturated fat acid of the cellular membranes and generate aldehydes, such as MDA (Uruñuela et al., 2002). In CBDO-induced pancreatitis, the inflammatory process might produce free radicals that in turn cause lipoperoxidation, detectable through the formation of the TBARS that generate MDA as the major aldehyde, a fact that was observed in the pancreas and lung of animals in the present study, concordant with previous findings (Sevillano et al., 2003; Shi et al., 2005). In this regard, EECp decreased MDA formation in the pancreatic and lung tissues. The dose-response data showed that only the high dose of EECp (400 mg/kg) was able to decrease MDA formation after 6 h of pancreatitis induction, but maintained this effect until 24 h after CBDO, which was also observed for two administrations of this ethanol extract. This indicates that EECp provided protection against the

oxidative stress caused by CBDO, an observation that completely agrees with prior findings that the aqueous (Alviano et al., 2008) or ethanolic (Silva et al., 2011) extracts of *C. pyramidalis* inner bark induce 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) consumption *in vitro*, a widely used antioxidant assay. In agreement with the antioxidant and anti-inflammatory effects of EECp, our results show that the production of NO was decreased in animals treated with this extract, as NO metabolites were detected at lower concentrations in the serum of these animals.

The inflammatory process and oxidative stress caused by pancreatitis in rats closely resemble this condition in humans, and EECp effectively decreased most of these alterations. However, another feature of clinical relevance in acute pancreatitis is abdominal pain (Vera-Portocarrero and Westlund, 2005; Frossard et al., 2008). Studying abdominal pain in CBDO-induced pancreatitis can be a difficult task because this model of induction involves a laparotomy. In spite of this complexity, a recent study has shown that in the model of common bile duct injection of secretory phospholipase A<sub>2</sub>-induced pancreatitis, which also involves laparotomy, it is possible to detect an early abdominal hyperalgesia after 4 h of the induction (Camargo et al., 2011). It is interesting that these authors reported that the stimulation of the abdominal region of rats, at this time a post-laparotomy procedure and ductal saline injection, did not alter the intensity of stimulus necessary to induce the withdrawal behavior. This was also observed in the present study, where the sham group did not show any significant alteration of the withdrawal threshold. In contrast, animals submitted to CBDO showed a time-dependent decrease of the intensity of stimulus applied in the abdominal region during the period of evaluation (0-24 h). It is

worth pointing out that this is the first description of abdominal hyperalgesia for CBDO-induced pancreatitis. A previous single administration of EECp (100-400 mg/kg) was able to inhibit abdominal hyperalgesia after 6 h of CBDO. Moreover, one single dose of 400 mg/kg completely inhibited hyperalgesia after 12 h of obstruction and partially reduced this phenomenon after 24 h. A second administration of EECp after 12 h of CBDO totally reversed abdominal hyperalgesia at the 24 h time point.

Of interest, it is worth mentioning that EECp induced an anti-hyperalgesic effect even at the lower dose used, which did not adequately reduce MPO activity in pancreatic tissue. In the same way, even in the lack of effect on pancreatic MPO activity after 24 h of CBDO in animals pretreated with one single dose of EECp, hyperalgesia was still reduced by this pretreatment. These observations indicate that EECp seems to have a more pronounced anti-hyperalgesic than anti-inflammatory effect or may have some components able to affect nociceptive pathways. The mechanisms underlying this effect are not understood, and further experiments are necessary to elucidate these facts.

Furthermore, this anti-hyperalgesic effect of EECp is reinforced by the findings of Santos et al. (2011). In this study, treatment with EECp reduced the nociception induced by acetic acid injection in the mouse abdominal region or formalin injection in the mouse paw, which is consistent with an analgesic component in this extract. As these effects could be affected by a possible central action of EECp, experiments were performed with rats treated or not with EECp in the open field. Since no alteration of the locomotor activity of rats was found in this apparatus, this suggests that EECp does not cause central

effects that could interfere in the measurement of abdominal hyperalgesia, reinforcing the results about the anti-hyperalgesic effects of EECp. This observation is in conformity with the findings that EECp administration to mice, in the same dose range used in the present study, did not change the performance of mice in the rota rod test (Santos et al., 2011).

These actions of EECp might be caused by its components. In this way, there are a number of compounds described in this plant, and many of them are phenolic compounds, especially flavonoids (Mendes et al., 2000; Bahia et al., 2005, 2010; Silva et al., 2011). The components of EECp are still unknown, and the present study has described that rutin, but not apigenin (found in the leaves of *Caesapinia pyramidalis*; Bahia et al., 2005), quercetin or baicalein, is likely to be present in EECp. Future studies are necessary to completely identify rutin and other components of this extract, which may be of value to understanding the effects of EECp. In the case of rutin, it was demonstrated that this flavonoid possesses anti-inflammatory, antioxidant and antinociceptive effects that could account for the amelioration of acute pancreatitis in rats, as observed in the present study. For instance, rutin decreased paw edema induced by carrageenan and arthritis induced by adjuvant plus carrageenan in rats (Guardia et al., 2001; Roteli et al., 2003). It also reduced nociception induced by glutamate in mice paws (Lapa et al., 2009), renal inflammation induced by cisplatin in rats (Arjumand et al., 2011) and cystitis induced by cyclophosphamide in mice (Boeira et al., 2011). These studies reinforce the possibility of a role for rutin in the effects observed in CBDO-induced pancreatitis in rats.

## 5. Conclusions

In summary, the present study has demonstrated that EECp decreased abdominal hyperalgesia and the local and systemic inflammation that occurs during CBDO-induced pancreatitis. This ethanol extract is of great interest as a source of novel molecules for developing strategies more appropriate in treating pancreatitis. Future studies are necessary in order to better identify the components of EECp and the mechanisms underlying these activities.

## 6. References

- Abela, J., Carter, C.R., 2010. Acute pancreatitis - a review. *Hepatobiliary Surgery II*. 28, 205-211.
- Agra, M.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17, 114-140.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista brasileira de Farmacognosia*. 18, 472-508.
- Albuquerque, U.P.D., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 325-354.

Al Mofleh, I.A., 2008. Severe acute pancreatitis: Pathogenetic aspects and prognostic factors. *World Journal of Gastroenterology*. 14, 675-684.

[Alviano, W.S.](#), [Alviano, D.S.](#), [Diniz, C.G.](#), [Antoniolli, A.R.](#), [Alviano, C.S.](#), [Farias, L.M.](#), [Carvalho, M.A.](#), [Souza, M.M.](#), [Bolognese, A.M.](#), 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*. 56, 545-552.

Arjumand, W., Seth, A., Sultana, S., 2011. [Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats.](#) *Food and Chemical Toxicology*. 49, 2013-2121.

Bahia, M.V., David, J.P., David, J.M., 2010. Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. *Química Nova*. 33, 1297-1300.

Bahia, M.V., Santos, J.B., David, J.P., David, J.M., 2005. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). *Journal of Brazilian Chemistry Society*. 16, 1402-1405.

Bang, U.C., Semb, S., Nøjgaard, C., Bendtsen, F., 2008. Pharmacological approach to acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 14, 2968-2976.

Barrett, T.D., Yan, W., Freedman, J.M., Lagaud, G.J., Breitenbucher, J.G., Shankley, N.P., 2008. Role of CCK and potential utility of CCK1 receptor antagonism in the treatment of pancreatitis induced by biliary tract obstruction. *British Journal of Pharmacology*. 153, 1650-1658.

Bathia, M., Brady, M., Shokuhi, S., Christmas, S., Neoptolemos, J.P., Slavin, J., 2000. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Journal of Pathology*. 190, 117-125.

[Bhatia, M.](#), [Wong, F.L.](#), [Cao, Y.](#), [Lau, H.Y.](#), [Huang, J.](#), [Puneet, P.](#), [Chevali, L.](#), 2005. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*. 5, 132-144.

Boeira, [V.T.](#), [Leite, C.E.](#), [Santos, A.A. Jr.](#), [Edelweiss, M.I.](#), [Calixto, J.B.](#), [Campos, M.M.](#), [Morrone, F.B.](#), 2011. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. [Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology](#). 384, 265-75.

Bose, R., Sutherland, G.R., Pinsky, C., 1989. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochemical Research*. 14, 217-220.

Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigation in Dermatology*. 78, 206-209.

Camargo, E.A., Zandoni, C.I., Toyama, M.H., Muscará, M.N., Docherty, R.J., Costa, S.K.P., 2011. Abdominal hyperalgesia in secretory phospholipase A<sub>2</sub>-induced rat pancreatitis: Distinct roles of NK<sub>1</sub> receptors. *European Journal of Pain*. (in press).

Capaz, F. R., Vanconcellos, L. E., Moraes, S., Neto, J. P., 1981. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*. 251, 228-236.

[Ceyhan, G.O.](#), [Michalski, C.W.](#), [Demir, I.E.](#), [Müller, M.W.](#), [Friess, H.](#), 2008.

Pancreatic Pain. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 22, 31-44.

[Desmarchelier, C.](#), [Romão, R.L.](#), [Coussio, J.](#), [Ciccía, G.](#), 1999. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 67, 69-77.

Dios, I., 2010. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics. 1, 15-20.

[Dios, I.](#), [Perez, M.](#), [Mano, A.](#), [Sevillano, S.](#), [Orfao, A.](#), [Ramudo, L.](#), [Manso, M.A.](#), 2002.

Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. Cytokine. 20, 295-303.

Forsmark, C.E., Baillie, J., 2007. Aga Institute Technical Review on Acute Pancreatitis. Gastroenterology. 132, 2022-2044.

Frossard, J.L., Steer, M.L., Pastor, C.M., 2008. Acute Pancreatitis. The Lancet. 371, 143-152.

Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R. 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. Methods in Enzymology 268, 237–246.

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Farmaco. 56, 683-687.

Hirata, M., Hayashi, I., Yoshimura, K., Ishii, K., Soma, K., Ohwada, T., Kakita, A., Majima, M., 2002. Blockade of bradykinin B2 receptor suppresses acute

pancreatitis induced by obstruction of the pancreaticobiliary duct in rats. *British Journal of Pharmacology*. 135, 29-36.

Lapa, F.R., Gadotti, V.M., Missau, F.C., Pizzolatti, M.G., Marques, M.C., Dafré, A.L., Farina, M., Rodrigues, A.L., Santos, A.R., 2009. [Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from \*Polygala paniculata\* L. in mice.](#) *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 104, 306-315.

Liddle, R.A., Nathan, J.D., 2004. Neurogenic Inflammation and Pancreatitis. *Pancreatology*. 4, 551-560.

McKay, C.J., Butter, A., 2003. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 3, 111-114.

Mendes, C.C., Bahia, M.V., David, J.M., David, J.P., 2000. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia*. 71, 205-207.

[Meyerholz, D.K.](#), [Williard, D.E.](#), [Grittmann, A.M.](#), [Samuel, I.](#), 2008. Murine pancreatic duct ligation induces stress kinase activation, acute pancreatitis, and acute lung injury. *The American Journal of Surgery*. 196, 675–682.

Pandol, S.J., Saluja, A.K., Imrie, C.W., Banks, P.A., 2007. Acute Pancreatitis: Bench to Beside. *Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology*. 133, 1056e1-1056e25.

Ramudo, L., Yubero, S., Manso, M.A., Recio, J.S., Weruaga, E., Dios, I., 2010. Effect of dexamethasone on peripheral blood leukocyte immune response in bile-pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Steroids*. 75, 362-367.

Rotelli, A.E., Guardia, T., Juárez, A.O., Rocha, N.E., Pelzer, L.E., 2003. [Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation](#). Pharmacological Research. 48, 601-606.

Samuel, I., Chaudhary, A., Fisher, R.A., Joehl, R.J., 2005. Exacerbation of acute pancreatitis by combined cholinergic stimulation and duct obstruction. The American Journal of Surgery. 190, 721-724.

[Samuel, I.](#), [Toriumi, Y.](#), [Yokoo, H.](#), [Wilcockson, D.P.](#), [Trout, J.J.](#), [Joehl, R.J.](#), 1994.

Ligation-Induced Acute Pancreatitis in Rats and Opossums: A Comparative Morphologic Study of the Early Phase. Journal of Surgical Research. 57, 299-311.

Santos, C.A., Passos, A.M.P.R., Andrade, F.C., Camargo, E.A., Estevam, C.S., Santos, M.R.V., Thomazzi, S.M., 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) in rodents. Brazilian Journal of Pharmacognosy. (in press).

Sevillano, S., [Mano, A.M.](#), [Manso, M.A.](#), [Orfao, A.](#), [Dios, I.](#), 2003. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. Biochimica et Biophysica Acta. 1639, 177-184.

Shi, C., Andersson, R., Zhao, X., Wang, X., 2005. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. Pancreatology. 5, 492-500.

Silva, C.H., Sobrinho, T.J., Castro, V.T., Lima Dda, C., Amorim, E.L., 2011. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and

*Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules*. 16, 4728-4739.

Silva, L.M.M., Matos, V.P., 1998. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - *Caesalpinaceae*) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - *Rhamnaceae*). *Revista Brasileira de Sementes*. 20, 263-269.

[Uruñuela, A.](#), Sevillano, S., [Mano, A.M.](#), [Manso, M.A.](#), [Orfao, A.](#), [Dios, I.](#), 2002. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1588, 159-164.

[Van Esch, A.A.](#), [Wilder-Smith, O.H.](#), [Jansen, J.B.](#), [Van Goor, H.](#), [Drenth, J.P.](#), 2006. Pharmacological management of pain in chronic pancreatitis. *Digestive and liver disease*. 38, 518-526.

Vera-Portocarrero, L. P., Lu, Y., Westlund, K. N., 2003. Nociception in persistent pancreatitis in rats: effects of morphine and neuropeptide alteration. *Anesthesiology*. 98, 474-484.

Vera-Portocarrero, L. P., Westlund, K.N., 2005. Role of Neurogenic Inflammation in Pancreatitis and Pancreatic Pain. *Neurosignals*. 14, 158-165.

Wang, G.J., Gao, C.F., Wei, D., Wang, C., Ding, S.Q., 2009. Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 15, 1427-1430.

Yubero, S., Ramudo, L., Manso, M.A., Dios, I., 2009. Targeting peripheral immune response reduces the severity of necrotizing acute pancreatitis. *Critical Care Medicine*. 37, 240-245.

[Zhou, M.T.](#), [Chen, C.S.](#), [Chen, B.C.](#), [Zhang, Q.Y.](#), [Andersson, R.](#), 2010. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: Mechanisms and potential intervention. *World Journal of Gastroenterology*. 16, 2094-2099.

## **7. Acknowledgements:**

The authors thank the Fundação de Apoio a Pesquisa e Inovação Tecnológica (FAPITEC/SE) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) for their financial support. SMT is recipient of CNPq productivity grant.