



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ALYNE MARA RODRIGUES DE CARVALHO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E  
ANTIINFLAMATÓRIA DA RIPARINA II (O-METIL-N-2-HIDROXI-  
BENZOIL TIRAMINA) EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

**FORTALEZA**

**2011**

**ALYNE MARA RODRIGUES DE CARVALHO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA  
RIPARINA II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL TIRAMINA) EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

**FORTALEZA  
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

C321e Carvalho, Alyne Mara Rodrigues de  
Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-metil-N-2-hidroxibenzoil tiramina) em modelos experimentais / Alyne Mara Rodrigues de Carvalho. – 2011.  
101 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Farmacologia Geral

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

1. Alcamidas Poliinsaturadas. 2. Inflamação. 3. Dor. I. Título.

---

CDD 616.0472

**ALYNE MARA RODRIGUES DE CARVALHO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA  
RIPARINA II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL TIRAMINA) EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

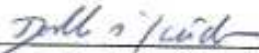
**Aprovada em 30 / 08 / 2011**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará**



---

**Prof. Dra. Danielle Silveira de Macedo**  
**Universidade Federal do Ceará**



---

**Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**  
**Universidade Federal do Ceará**

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar

Aos meus pais e minha avó, por terem apoiado minhas decisões em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos pela convivência amiga, pelas risadas e brincadeiras na hora de descontração;

Aos meus sobrinhos, “criaturinhas” iluminadas que enchem meu coração de alegria e esperança

Ao Leonardo, pela dedicação, compreensão e companheirismo seja em momentos ruins ou em momentos bons, pela sua generosidade, humildade e seu grande amor. Uma pessoa com um coração puro que me faz feliz.

Aos meus amigos cuja pureza de coração e nobreza de caráter sempre me foram revigorantes: Camila, Mariana, Nathalia, Roberta, JV, Camylla, Tatiana, Thamires e Mariana. Agradeço por terem sido sempre honestas, gentis e presentes quando necessitei. Essa vitória também é de vocês!!!

À minha orientadora, Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, pela orientação competente e pela amizade demonstrada em cada ensinamento e conselhos durante toda essa caminhada. Obrigado por ter acreditado em mim.

A Aline Oliveira que me ensinou os primeiros experimentos no laboratório.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação em Farmácia, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e grandes risadas

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que contribuíram para com a minha formação científica.

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante a pós-graduação Nayrton, Emiliano e Marília. Agradeço por sempre ter encontrado incentivo, inúmeras idéias e pelo enorme apoio em vários experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Thici, Fernando, Belzinha, Cacá, Edith, Luciana, Mariana (s), Brinell, Helvira, Maria Izabel, Gersilene, Fernanda, Patrícia Xavier e outros. Com vocês, terminei-me sentindo parte de uma grande família.

Os técnicos do Laboratório de Neurofarmacologia, Vilani (prima), Lena e Arnaldo (Arnoldo), pela ajuda, pela companhia constante e pela animação no laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia incluindo Aura Rhanes, Márcia, Alana, Ana Paula, Fernando, Haroldo, Cícera pela dedicação ao trabalho

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento pessoal e profissional.

## RESUMO

A riparina II, uma alcalamida isolada do fruto não maduro de *Aniba riparia*, foi avaliada em modelos animais para avaliação de drogas com atividade antinociceptiva e antiinflamatória, tais como contorções abdominais induzidas por ácido acético; teste da formalina; placa quente; teste da nocicepção induzida por capsaicina; teste da nocicepção induzida por glutamato; edemas de pata induzido por carragenina, dextrano, histamina e serotonina e peritonite induzida por carragenina e fMLP. Foram utilizados camundongos *Swiss* (20-30g) ou ratos *Wistar* (150-250g). A riparina II foi administrada de forma aguda em todos os testes, nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral. Os resultados mostraram que a riparina II demonstrou possuir atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção visceral induzida por ácido acético. O pré tratamento com a riparina II reduziu significativamente a nocicepção inflamatória induzida pela segunda fase da formalina, mas não alterou a nocicepção neurogênica induzida pela primeira fase do teste da formalina. Também reduziu a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato e capsaicina. A riparina II não demonstrou atividade no modelo de nocicepção térmica da placa quente. Nos modelos de edema de pata induzidos por carragenina e dextrano, os animais tratados com a riparina II exibiram edemas menores em comparação com os animais tratados apenas com o veículo. Riparina II foi capaz de reduzir os edemas de pata induzidos por histamina e bradicinina, mas não o edema induzido por serotonina. No modelo de peritonite induzida por carragenina (agente quimiotático indireto) e por fMLP (agente quimiotático direto), a riparina II foi capaz de reduzir o influxo de leucócitos, a atividade da enzima mieloperoxidase e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal. Em síntese, esses resultados indicam que a riparina II possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória em modelos químicos de dor e inflamação. Além disso, a riparina II pode estar inibindo direta ou indiretamente a ação, produção ou liberação de mediadores pró inflamatórios envolvidos na geração da dor e da inflamação. A ação antiinflamatória foi confirmada pelos achados histopatológicos, com a redução do edema e infiltrado inflamatório.

Palavras-chave: Riparina II. Nocicepção Inflamação. Alcalamidas

## ABSTRACT

Riparin II, an alcamide isolated from the green fruit of *Aniba riparia*, was tested in animal models, such as acetic acid-induced abdominal writhing, formalin test, hot plate test, capsaicin and glutamate-induced nociception, paw edema induced by carrageenan, dextran, histamine and serotonin and peritonitis induced by carrageenan and fMLP, in order to evaluate its antinociceptive and antiinflammatory activities. Male *Swiss* mice (20-30g) and male *Wistar* rats (150-250g) were treated by gavage with riparin II at the doses of 25 and 50 mg/kg. The results show that riparin II demonstrated an antiinflammatory activity at the animal model of acetic acid-induced abdominal writhing. The pretreatment with riparin II reduced significantly the nociception induced by glutamate and capsaicin, and also the inflammatory nociception induced at the second phase of the formalin test, but was not able to reduce the neurogenic nociception induced at the first phase of the test. Riparin II did not show any activity at the hot plate test. At the animal models of paw edema induced by carrageenan and dextran, the animals treated with riparin II showed lower edema when compared to the control group. The treatment with Riparin II was able to reduce the paw edemas induced by histamine and bradykinin, but not the edema induced by serotonin. At the model of peritonitis induced by carrageenan (indirect chemotactic agent) and by fMLP (direct chemotactic agent), the treatment with riparin II reduced the influx of leukocytes, the activity of the enzyme myeloperoxidase and also the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the peritoneal fluid. In summary, these results indicate that riparin II has an antinociceptive and antiinflammatory activity in chemical models of nociception and inflammation. Besides that, riparin II might be inhibiting directly or indirectly the activity, production or releasing of pro-inflammatory mediators involved at the generation of pain and inflammation. The antiinflammatory activity was confirmed through the histopathological findings, with the reduction of the edema and the inflammatory infiltrate.

Keywords: Riparin II. Nociception. Inflammation. Alcamides.



## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	Aniba riparia	17
<b>2</b>	Estrutura química da riparina II	18
<b>3</b>	Interação das vias ascendentes e descendentes na dor	21
<b>4</b>	Coleta do fluido peritoneal em ratos	41
<b>5</b>	Efeito da administração oral de riparina II e indometacina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	44
<b>6</b>	Efeito da riparina II e morfina sobre o tempo de lambadura (s) da pata direita traseira na primeira (0-5 minutos) e segunda fase (20-25 minutos) no teste da nocicepção induzida pela formalina.	46
<b>7</b>	Efeito da riparina II no teste da capsaicina em camundongos.	47
<b>8</b>	Efeito da riparina II no teste da nocicepção induzida por glutamato em camundongos.	48
<b>9</b>	Efeito da riparina II no edema de pata induzido por carragenina em ratos.	49
<b>10</b>	Efeito da riparina II no edema de pata induzido por dextrano em ratos.	50
<b>11</b>	Efeito da riparina II no edema de pata induzido por histamina, serotonina e bradicinina.	52
<b>12</b>	Efeito da riparina II sobre a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina e por fMLP na cavidade peritoneal de ratos.	54
<b>13</b>	Efeito da riparina II sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no fluido peritoneal de ratos	55
<b>14</b>	Efeito da riparina II sobre a concentração de proteínas no fluido peritoneal de ratos com peritonite induzida por carragenina.	56
<b>15</b>	Efeito da riparina II, por via oral, nos níveis de TNF- $\alpha$ e L-1 $\beta$ no fluido peritoneal de ratos.	58

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção	25
<b>2</b>	Efeito da riparina II (25 e 50 mg/kg e morfina (7,5 mg/kg) no teste da placa quente em camundongos	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>µg</b>	- Micrograma
<b>δ</b>	- Delta
<b>μ</b>	- Mu
<b>κ</b>	- Kappa
<b>5-HT</b>	- 5- hidroxitriptamina (Serotonina)
<b>AA</b>	- Ácido aracdônico
<b>AMPC</b>	- Adenosina 3', 5' monofosfato cíclica
<b>ATP</b>	- Trifosfato de adenosina
<b>AAS</b>	- Ácido acetilsalicílico
<b>ANOVA</b>	- Análise de Variância
<b>BK</b>	- Bradicinina
<b>C3a</b>	- Terceiro componente do sistema complemento ativado
<b>C5a</b>	- Quinto componente do sistema complemento ativado
<b>Cg</b>	- Carragenina
<b>CGRP</b>	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>COX</b>	- Cicloxigenase
<b>Dexa</b>	- Dexametasona
<b>eNOS</b>	- Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase
<b>E.P.M.</b>	- Erro Padrão da Média
<b>fMLP</b>	- N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
<b>HE</b>	- Hematoxilina Eosina
<b>GMPc</b>	- Adenosina 3', 5' monofosfato cíclica
<b>HETE</b>	- Ácido hidroxicicosatetraenóico
<b>HPETE</b>	- Hidroperoxicicosatetraenóicos
<b>ICAM-1/ ICAM-2</b>	- Moléculas de adesão intracelular- 1 e 2 (inglês: intracellular adhesion molecule)
<b>IFN-α ou γ</b>	- Interferon alfa ou gama
<b>IL</b>	- Interleucina
<b>iNOS</b>	- Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase
<b>LT</b>	- Leucotrienos
<b>i.p.</b>	- Intraperitoneal
<b>kg</b>	- Kilograma
<b>LX</b>	- Lipoxinas
<b>MAPK</b>	- Proteína quinase ativada por mitógenos
<b>mL</b>	- Mililitros
<b>MPO</b>	- Mieloperoxidase
<b>nm</b>	- Nanômetros
<b>nmol</b>	- Nanomols
<b>nNOS</b>	- Isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase

<b>NF- <math>\kappa</math>B</b>	- Fator de transcrição nuclear Kappa B
<b>p</b>	- Nível de significância
<b>PAF</b>	- Fator de ativação de plaquetas
<b>PGs</b>	- Prostaglandinas
<b>PGD2</b>	- Prostaglandina da série D2
<b>PGE2</b>	- Prostaglandina da série E2
<b>PGI2</b>	- Prostaglandina da série F do tipo 2
<b>PMN</b>	- Polimorfonucleares
<b>rpm</b>	- Rotações por minuto
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	- Fator de necrose tumoral alfa
<b>TX</b>	- Tromboxano
<b>UI</b>	- Unidades Internacionais
<b>VCAM-1</b>	- Molécula de adesão vascular
<b>v.o.</b>	- Via oral
<b>vs</b>	- Versus

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	PARTE I	14
1.1.1	Produtos Naturais	14
1.1.2	Família <i>Lauraceae</i>	15
1.1.3	<i>Aniba riparia</i>	16
1.1.4	Riparina II (O-Metil-N-2-hidroxibenzoil-tiramina)	17
1.2	PARTE II	19
1.2.1	Dor	19
1.2.2	Nocicepção	21
1.2.2.1	Mediadores envolvidos no Processo Nociceptivo	23
1.2.3	Inflamação	26
1.2.3.1	Mediadores envolvidos no Processo Inflamatório	27
1.2.4	Relevância e Justificativa	32
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Material Botânico	35
3.2	Extração e Isolamento	35
3.3	Drogas e Reagentes	35
3.4	Equipamentos e Materiais	36
3.5	Animais Experimentais	37
3.6	Avaliação da Atividade Antinociceptiva	38
3.6.1	Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	38
3.6.2	Teste da Placa Quente	38
3.6.3	Teste da Formalina	38
3.6.4	Teste da Nocicepção induzida por Capsaicina	39
3.6.5	Teste da Nocicepção induzida por Glutamato	39
3.7	Avaliação da Atividade Antiinflamatória	39
3.7.1	Edema de Pata induzido por Carragenina	39
3.7.2	Edema de Pata induzido por Dextrano	40
3.7.3	Edema de Pata induzido por Histamina, Serotonina e Bradicinina em ratos	40

3.7.4	Peritonite induzida por agente quimiotático indireto (carragenina-Cg) e direto (fMLP)	40
3.7.5	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no fluido peritoneal de ratos	41
3.7.6	Determinação do conteúdo de proteínas no fluido peritoneal de ratos	42
3.7.7	Avaliação da concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ e no fluido peritoneal	42
3.8	Análise Estatística	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Avaliação da Atividade Antinociceptiva	44
4.1.1	Efeito da riparina II nas Contorções Abdominais induzidas por Ácido Acético em camundongos.	44
4.1.2	Efeito da riparina II no Teste da Placa Quente em camundongos	45
4.1.3	Efeito da riparina II na Nocicepção induzida por Formalina em camundongos	46
4.1.4	Efeito da riparina II na Nocicepção induzida pela Capsaicina em camundongos	47
4.1.5	Efeito da riparina II na Nocicepção induzida por Glutamato em camundongos	48
4.2	Avaliação da Atividade Antiinflamatória	49
4.2.1	Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Carragenina em ratos.	49
4.2.2	Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Dextrano em ratos.	50
4.2.3	Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Histamina, Serotonina e Bradicinina em ratos.	51
4.2.4	Peritonite induzida por Carragenina (Cg) ou fMLP em ratos	53
4.2.5	Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no fluido peritoneal de ratos	55
4.2.6	Determinação do conteúdo de proteínas no fluido peritoneal de ratos	56
4.2.7	Avaliação dos níveis de e TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$ no fluido peritoneal de ratos	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PARTE I

### 1.1.1 Produtos naturais

O tratamento e a cura de muitas doenças através da utilização de plantas vêm sendo feita ao longo da história. Ainda hoje, em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas (MACIEL *et al.*, 2002). Atualmente, cerca de 25 - 30% de todos os remédios utilizados na terapêutica são de origem natural, sejam elas derivados de plantas, microorganismos e animais ou como precursores de alguns compostos. Além disso, o Brasil tem uma das maiores biodiversidade do mundo, possuindo cerca de 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes no planeta (CALIXTO, 2005). Embora, plantas medicinais seja muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos, o conhecimento agregado perante toda essa biodiversidade ainda é pequeno (MACIEL *et al.*, 2002; CALIXTO, 2005).

O primeiro, e um dos maiores exemplos do desenvolvimento de fármacos a partir de vegetais é o ácido salicílico, obtido das cascas de espécies de salgueiro (*Salix spp*). As propriedades analgésicas e antipiréticas destas cascas são conhecidas de antigas civilizações, como o antigo Egito, Grécia, Índia e Roma. A oxidação da salicina, um constituinte da casca do salgueiro, origina o ácido salicílico, que teve seu uso limitado por causar intensa irritação gástrica. Mais tarde, a acetilação da molécula deu origem ao ácido acetilsalicílico, um dos fármacos de maior sucesso da história (ROBERTS II; MORROW, 2003; SETTY; SIGAL, 2005).

As plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos. A indicação de plantas medicinais aumenta a opção terapêutica, ofertando medicamentos equivalentes, e talvez com indicações terapêuticas complementares as medicações existentes sem substituir os medicamentos já comercializados e registrados (DI STASI, 1995; SIMÕES *et al.*, 1999).

Produtos naturais, incluindo os derivados de plantas superiores têm dado, nos últimos anos, grande contribuição para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas. A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por interferir, direta

ou indiretamente, com moléculas ou mecanismos como mediadores inflamatórios, exemplos são os metabólitos do ácido aracdônico e as citocinas; produção e/ou ação de segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, proteínas quinases e cálcio; expressão de fatores de transcrição como o NF-kB, e de proto-oncogenes, c-jun e c-fos; e intervenção na expressão de moléculas pró-inflamatórias como a iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , neuropeptídeos e proteases (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz. O emprego de técnicas modernas de farmacologia, biologia molecular e toxicologia renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (SIMÕES, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000).

#### 1.1.2 Família *Lauraceae*

A família Lauraceae é considerada uma das famílias de plantas mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. As Lauraceae apresentam-se amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formadas por 49 gêneros e 2.500 - 3.000 espécies (WERFF; RICHTER, 1996). Esta família revela um número expressivo de espécies que apresentam uma grande diversidade de usos, com destaque para as que possuem utilização medicinal e na indústria. O alto valor econômico destas espécies tem levado a uma exploração crescente ao longo dos anos, fazendo com que estas se tornem “vulneráveis” ou mesmo “em perigo de extinção”, segundo classificação da União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (I.U.C. N) (VIEIRA *et al.*, 1997).

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies que são utilizadas em larga escala são o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*). A casca ou o fruto de algumas espécies são usados como condimentos (*Dicypellium caryophyllaceum*) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies, como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). Outras têm usos na medicina popular ou industrial, como a cânfora (*Cinnamomum camphora*) (VICENTINI *et al.*, 1999).



### 1.1.3 *Aniba riparia*

Dentre as espécies medicinais, merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*. Esse é composto por aproximadamente 41 espécies que se distribuem na América Central, Antilhas e, principalmente, América do Sul. A maior concentração do número de espécies encontra-se na região das Guianas e na Amazônia Central. No Brasil, o gênero é representado por cerca de 25 espécies, dentre elas a *Aniba riparia* (Ness) Mez (QUINET; ANDREATA, 2002) (**Figura 1**).

A espécie *Aniba riparia* (Ness) Mez é típica da região amazônica, sendo popularmente conhecida como louro amarelo (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1988). Seus frutos contêm diversos constituintes químicos, como por exemplo, flavonóides, neolignanas, stirilpironas e alcanidas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Esta última classe de substância tem sido fonte de interesse de pesquisadores na busca de novas fontes vegetais com princípios farmacologicamente ativos (CASTELO-BRANCO, 2000).

Éteres metílicos de N-benzoiltiramina (riparina I), de N-(2-hidroxibenzoil) -tiramina (riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III), isoladas dos frutos de *Aniba riparia* (Ness) Mez, apresentam diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antimalárica, schistossomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992).



**Figura 1. Aniba riparia**

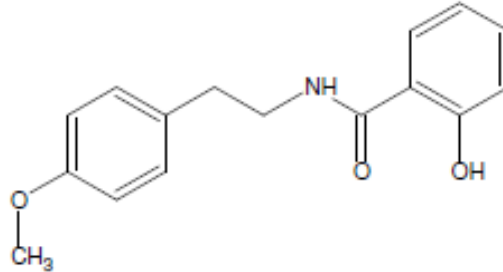
Fonte: <http://web.science.uu.nl/Amazon/VTGG/Lauraceae/Aniba/slides/Anibariparia.html>

#### 1.1.4 Riparina II (O- metil-N-2-hidroxibenzoil-tiramina)

A riparina II foi isolada e sintetizada, pela primeira vez, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990).

Isolada do fruto verde de *Aniba riparia*, a riparina II é um alcalóide do ciclo não heterocíclico, mais especificamente, uma alcalamida natural. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina, e o ácido benzóico. Apresenta uma substituição no anel do ácido

benzóico, acrescentando uma hidroxila e o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter. (**Figura 2**)



**Figura 2. Estrutura química da riparina II**

Fonte: (CASTELO-BRANCO, 1992)

Foi demonstrado que essa alcaloide é capaz de induzir, de forma não específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia e por ocitonina e bradicinina em útero de rata virgem, com valores de CI<sub>50</sub> variando de 1,7 - 5,0 µg/mL (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Também foi capaz de causar uma diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos acordados e não estressados, nas doses de 1 mg/Kg, via intraperitoneal, e que parece envolver um componente de origem parassimpática (SEIXAS, 1996).

Em relação à toxicidade aguda da droga verificou-se que riparina II quando administrada por via oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.) em doses de até 1 g/kg não causou mortes de camundongos durante 48 h. Ela também não apresentou alterações centrais, autonômicas ou musculares na dose de 500 mg/kg, v.o. e i.p. em testes hipocráticos (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Além disso, alguns trabalhos têm sido realizados por nosso grupo, considerando os efeitos desta substância no sistema nervoso central, uma vez que ela apresenta em sua estrutura química, a tiramina, uma amina simpaticomimética de ação indireta. Os dados desses trabalhos mostraram que a riparina II exibe efeitos ansiolíticos (SOUSA *et al.*, 2007) e antidepressivos (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

## 1.2 PARTE II

### 1.2.1 Dor

A dor foi conceituada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais”. Julius *et al.* (2001) descrevem a dor como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo. Vários estudos descrevem o papel fisiológico da dor como um alarme que tem a função de proteger o organismo ativando reações e induzindo comportamentos de precaução, que podem diminuir o que estiver causando a dor e, como resultado, limitar os danos (MARKENSON, 1996; MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

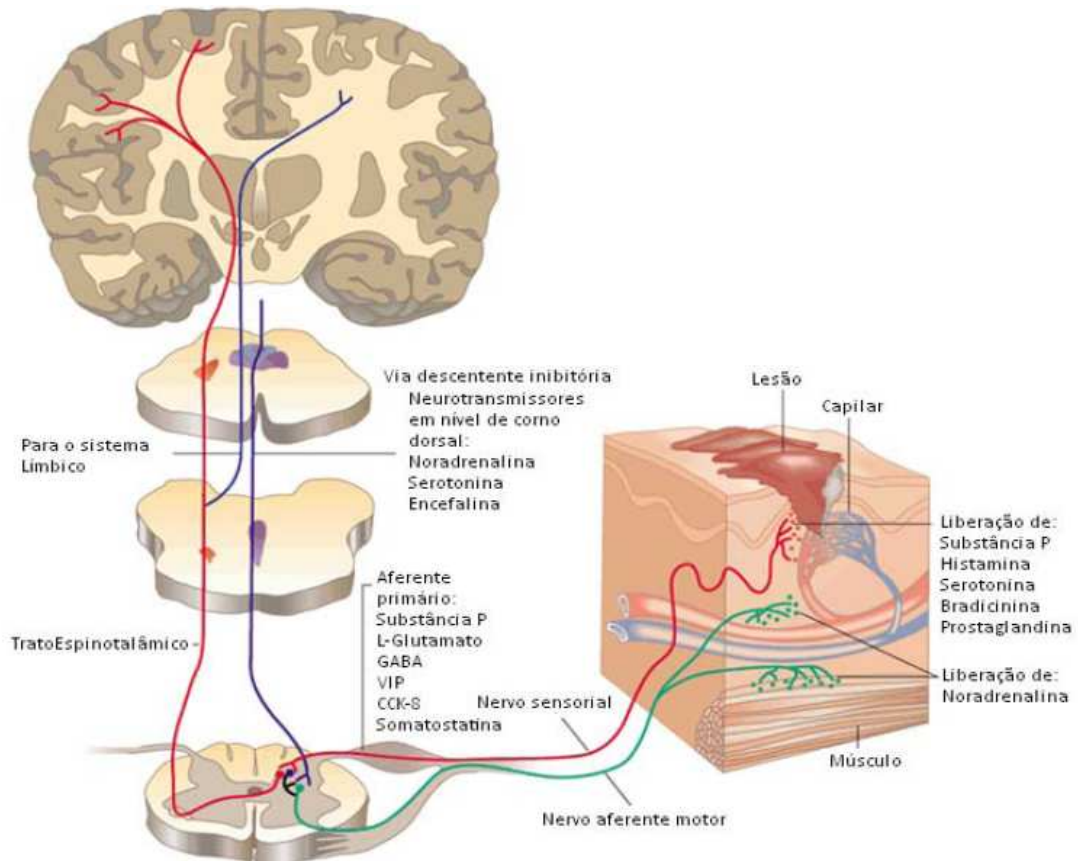
A dor possui dois componentes principais: o componente sensorial e o componente emocional/afetivo. O componente sensorial permite por meio da ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo e corresponde ao mecanismo neurofisiológico. O componente emocional corresponde a percepção do estímulo pelo indivíduo, que é seguida pela tomada de consciência e reação a dor (RAMADABRAN; BANSINATH, 1996).

Quanto à duração de ação, a dor pode ser classificada como aguda, transitória (passageira) ou crônica. A dor passageira é caracterizada por ativação de nociceptores tanto da pele quanto de outros tecidos e ocorre na ausência de qualquer dano tecidual, ela tem curta duração e acaba por se dissipar dentro de poucos segundos ou minutos sem a necessidade de utilização de medicamento; provavelmente sua função é proteger o indivíduo de um possível dano tecidual. A dor aguda geralmente está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores no local da lesão, e pode persistir por dias ou poucas semanas e desaparece quando ocorre recuperação da lesão (CAAR; GOUDAS, 1999). Já a dor crônica ocorre devido a uma patologia ou uma lesão, podendo ser perpetuada por fatores diferentes do causador primário e pode permanecer por meses ou anos. A dor crônica é distinta da aguda pelo fato de ocorrer plasticidade do sistema nervoso central e periférico e por manter-se após a recuperação tecidual, o que a torna de difícil tratamento perante a utilização de fármacos (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

A dor pode também ser classificada quanto a sua fisiopatologia, em nociceptiva, neuropática e psicogênica. A dor nociceptiva ocorre se os mecanismos de sustentação da dor envolvem lesão tecidual e pode envolver tanto estruturas viscerais como somáticas. Já a dor neuropática é proveniente do processamento somatosensorial anormal a nível central ou periférico. E por fim, a dor psicogênica ocorre quando existe uma dor persistente sem evidência de má desordem que poderia causar a dor. (BEERS, 2003).

A dor compreende três mecanismos básicos: a **transdução**, que é a ativação dos nociceptores por um estímulo nódico (que pode ser mecânico, térmico ou químico); a **transmissão**, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso seja conduzido ao SNC; e **modulação**, que são as vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004)

Classicamente, a transmissão da dor se faz por uma via bem conhecida. Os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (SG) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor onde existe a percepção da dor (RUSSO; BROSE, 1998) (**Figura 3**).



**Figura 3. Interação das vias ascendente e descendente na dor.**

Após um dano tecidual, ocorre a liberação de mediadores químicos locais que podem sensibilizar ou ativar nociceptores periféricos, levando a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal. Estes neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem e o sinal ascende para principalmente para o tálamo (trato espinotalâmico). Em resposta a estimulação nociceptiva ascendente, ocorre à ativação de algumas vias descendentes de controle, modulando o sinal nociceptivo.

Fonte: [www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=2&materia\\_id=454&materiav](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=2&materia_id=454&materiav)

Devido ao aspecto desagradável da dor, o desconforto que esta causa, muitas vezes até agravando o estado da doença, inúmeros pesquisadores estão envolvidos nos estudos dos mecanismos moduladores desta, concentrando forças para mapear suas vias visando modular através de meios farmacológicos ou cirúrgicos (IADAROLA; CAUDLE, 1997; BESSON, 1999).

### 1.2.2 Nocicepção

O termo nocicepcao foi introduzido por Sherrington (1906) para diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor, propriamente dita.

A nociceção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo, ou seja, é um processo puramente fisiológico, o qual envolve estruturas neurais que codificam e processam o estímulo nocivo (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; LOESER *et al.*, 2008). Compreende a atividade no nociceptor (*noci* é uma palavra derivada do latim *nocere*, que significa ferir) como também suas vias e processos facilitados pelo estímulo doloroso (DICKENSON; BESSON, 1997). Sendo assim, a nociceção também pode ser definida como o processo que se refere à recepção de sinais no SNC evocados pela ativação de nociceptores, ativação esta proveniente de dano tissular (JESSEL; KELLY, 1991).

Os nociceptores podem responder a uma variedade de estímulos os quais disparam potenciais de ação em neurônios aferentes primários. Eles possuem corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, que enviam um ramo axonal para a periferia e outro para a medula espinhal ou tronco encefálico (JULIUS *et al.*, 2001). O impulso nervoso gerado por tal (is) estímulo(s) se propaga pela fibra nervosa ascendente até a medula espinhal, desta para o córtex cerebral, onde serão comandadas e geradas as respostas fisiológicas, emocionais e comportamentais (MUIR III, 1998).

As fibras responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC são:

- **Fibras C:** não são mielinizadas e apresentam o menor diâmetro. Respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química e por isso, são denominados nociceptores polimodais (LAWSON, 2002; COUTAUX *et al.*, 2005). Cerca de 60-90% dos neurônios aferentes primários, de origem cutânea ou de tecidos mais profundos correspondem a fibras do tipo C.

- **Fibras A $\delta$ :** possuem pouca mielina e apresentam diâmetro intermediário. Propagam o sinal de forma mais rápida que a fibra do tipo C. Os nociceptores relacionados a esta fibra respondem a estímulos nocivos de origem térmica e mecânica (JULIUS; BASBAUM, 2001). Dividem-se em tipo I e tipo II. As fibras do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas em torno de 53 °C, enquanto que as fibras do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C (LAWSON, 2002; CRAIG, 2003; COUTAUX *et al.*, 2005).

- **Fibras A $\beta$** : são encobertas por grande quantidade de mielina, de diâmetro grande. Sua principal função é a percepção de estímulos como o toque não nocivo. A estimulação direta em qualquer frequência dessas fibras, em humanos, conduz rapidamente o estímulo, porém, não produzem sensações descritas como dolorosas (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

A ativação dos nociceptores em resposta a estímulos nocivos leva à despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra (WOOLF; SALTER, 2000). Quando um dano inicial (lesão ou induzido por inflamação) ativa os nociceptores locais, as fibras nervosas A $\delta$  e C ficam sensibilizadas e assumem limiares de ativação mais baixos. Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A $\delta$  (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambe o morder a área lesada ou reflexo de retirada da parte do corpo agredida, uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor. Tais comportamentos são denominados comportamentos nociceptivos. Portanto, drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas, e aquelas que induzem o comportamento nociceptivo são chamadas pró nociceptivas ou algogênicas. (DOUGLAS, 1999).

#### 1.2.2.1 Mediadores envolvidos no Processo Nociceptivo

Muitos mediadores pró-inflamatórios interagem com seus receptores presentes em nociceptores, causando tanto sensibilização, quanto ativação destes neurônios nociceptivos (BESSON, 1999; MILLAN, 1999; JULIUS *et al.*, 2001). Mediadores químicos como o glutamato, serotonina, ATP, prótons, adenosina, dentre outros, liberados frente a uma lesão tecidual, podem atuar diretamente em canais iônicos presentes em neurônios nociceptivos e por eles proporcionar o influxo de cátions para o interior da célula, o que conseqüentemente deflagra o potencial de ação (JULIUS *et al.*, 2001; GRUNDY, 2002). Entretanto, outros mediadores inflamatórios, como a bradicinina (BK), substância P (SP) e as prostaglandinas (PGs), não atuam diretamente em canais iônicos, e sim em receptores de sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, podendo causar tanto ativação, quanto sensibilização nos nociceptores (LEVITAN, 1994).



Os principais mediadores que participam da nocicepção inflamatória bem como algumas características que devem ser ressaltadas sobre os mesmos estão relacionados na tabela 1.

**Tabela 1. Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.**

MEDIADOR	EFEITO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
Óxido Nítrico (NO)	Sensibilização do nociceptor	Analgesia ou hiperalgesia, dependendo da concentração	OKUDA <i>et al.</i> , 2001 DOURSOUT <i>et al.</i> , 2003 SOUSA; PRADO, 2001
Bradicینina (BK)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia mediada por receptores B1 e B2, sensibilização de receptores TRPV1, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor neuropática	DRAY, 1997 STERANKA <i>et al.</i> , 1988 LOPES <i>et al.</i> , 1995 NI <i>et al.</i> , 1998 DRAY; PERKINS, 1993 AUNSTIN <i>et al.</i> , 1997 FERREIRA <i>et al.</i> , 1993 MATHIS <i>et al.</i> , 1996 ANDREVA; RANG, 1993
Substância P (SP)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato	TEOH <i>et al.</i> , 1996 CARLTON <i>et al.</i> , 1998 LOFGREN <i>et al.</i> , 1999 FURST, 1999 TURNBACH; RANDICH, 2002
Prostaglandinas (PGS)	Sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em modelos de dor inflamatória e neuropatia sensível aos inibidores da ciclooxigenase	MALMBERG; YAKSH, 1995 BEICHE <i>et al.</i> , 1996 YANG <i>et al.</i> , 1996 TOTANI <i>et al.</i> , 2001 SYRIATOWICZ <i>et al.</i> , 1999
Citocinas pró inflamatórias e TNF- $\alpha$	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica	STEIN <i>et al.</i> , 1988 CUNHA <i>et al.</i> , 1991 GEORGE <i>et al.</i> , 2005 MURPHY <i>et al.</i> , 1999 FUKUOKA <i>et al.</i> , 1994
Serotonina (5-HT)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em humanos através da excitação das fibras C e A $\delta$ , (principalmente pela ligação em 5-HT3)	JULIUS <i>et al.</i> , 2001 MILAN, 1999
Fator de Crescimento Neural (NGF)	Sensibilização do nociceptor	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	MARCHAND <i>et al.</i> , 2005

### 1.2.3 Inflamação

A inflamação é conceituada como a resposta do organismo frente a agentes infecciosos, antígenos e lesões teciduais que tem como função acabar com agentes irritantes, microorganismos e potencializar a reparação tecidual. Entretanto, a exacerbação da reação inflamatória pode causar descompensação fisiológica, disfunção em órgãos e até mesmo a morte (LIEW, 2003). A nível tecidual ou celular, a inflamação pode ser definida como uma cascata inflamatória que envolve uma sequência de eventos, como dilatação de vênulas e arteríolas, aumento do fluxo sanguíneo, infiltração de leucócitos, extravasamento de proteínas plasmáticas, aumento da atividade das proteases e espécies reativas do oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de mediadores pró inflamatórios (HUERRE *et al.*, 1996; VIVIER *et al.*, 2005).

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas, foi descrita há mais de 2.000 anos atrás por Cornelius Celsius, que observou os quatro sinais cardinais da inflamação: dor, rubor (hiperemia), calor (aumento da temperatura local) e tumor (edema). A estes sinais, Galeno, acrescentou um quinto sinal cardinal, a perda de função da área afetada (WANNMACHER; FERREIRA, 2004; ROCK; KONO, 2008). Em 1793, John Hunter, um cirurgião escocês, observou que a inflamação não é uma doença, e sim uma resposta inespecífica que tem um efeito salutar sobre seu hospedeiro (ROCHA; GARCIA, 2006).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas categorias, levando em consideração sua duração, em inflamação aguda e em inflamação crônica. A inflamação aguda é de curta duração, caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular, extravasamento de fluidos ricos em proteínas e migração de células (principalmente neutrófilos) (CARRAWAY; WELTY-WOLF; MILLER, 2003). Já a inflamação crônica é caracterizada por predomínio de macrófagos que secretam mediadores inflamatórios que iniciam e mantêm um ciclo de lesão e reparo tecidual, resultando em remodelagem do tecido. Nesse processo crônico, os eventos descritos anteriormente podem originar degeneração tecidual e fibrose, sendo responsável pelos sintomas de muitas doenças auto-imunes e pode constituir uma importante causa de rejeição de transplante de órgãos (WANNMACHER; FERREIRA, 2004; GOLAN *et al.*, 2008).

Vários tipos de células participam do processo inflamatório, desempenhando funções distintas. Quando o epitélio (que funciona como uma barreira) é danificado, ocorre a ativação de células residentes como macrófagos, que englobam e degradam o agente invasor (SCHMID; SCHONBEIN, 2006). Essas células quando ativadas iniciam um processo de sinalização de vias intracelulares que culmina na síntese de mediadores que participam do processo inflamatório. Uma das vias que podem ser ativadas é a do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que ativa a transcrição de genes para muitas proteínas pró-inflamatórias, tais como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), dentre outras (BROCHU; OLIVIER; RIVEST, 1999; LAFLAMME *et al.*, 1999; SCHMID SCHONBEIN, 2006).

#### 1.2.3.1 Mediadores envolvidos no processo inflamatório

Os sinais clínicos da inflamação citados acima são ocasionados pelo aumento da permeabilidade vascular, particularmente das pequenas vênulas, com extravasamento de fluido para a área lesionada. Este processo é desencadeado através de mediadores químicos, que podem ser de origem plasmática ou celular. Dentre eles podemos destacar:

##### - **Aminas vasoativas**

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) como o nome implica, são aminas com ação sobre a vasculatura. São mediadores armazenados em grânulos celulares, com rápida ação, liberados imediatamente após a ação do estímulo agressor. Agem principalmente sobre os vasos sanguíneos e estão entre os mediadores responsáveis pela sensação de dor na inflamação, através de sua ação sobre os neurônios sensoriais (DRAY, 1995).

A **histamina** é uma amina vasoativa presente principalmente nos mastócitos. Sua liberação ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2000; SCHARAMM; THORLACIUS, 2004; SILVA; CARVALHO, 2004). A liberação localizada de histamina e sua ação principalmente nos receptores H1 na microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular, promove também a síntese

de prostaciclina e induz a liberação de óxido nítrico pelo endotélio. O aumento da permeabilidade vascular ocorre por meio da contração das células endoteliais e subsequente formação de abertura das junções celulares endoteliais, resultando no extravasamento plasmático. (KUMAR *et al.*, 2005; JUTEL *et al.*, 2009).

A **serotonina (5-HT)** é produzida por células enterocromafins, encontrada no epitélio do trato gastrointestinal, e absorvida pelas plaquetas (YOUNG; FURNESS, 1995; RACKE; SCHWORER, 2000). É um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para a dor e prurido, sendo também responsável por produzir rubor (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; KATZUNG, 2006). A 5-HT possui ações semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

#### **- Metabólitos derivados do ácido araquidônico**

Os metabólitos do ácido araquidônico (AA) são derivados de fosfolipídios e ácidos graxos liberados das membranas plasmáticas após a agressão. Ocorrem em todos os tecidos e são produzidos principalmente pela atividade de neutrófilos e macrófagos (FITZGERALD; PATRONO, 2001). Uma vez liberado, o AA é metabolizado por duas principais vias enzimáticas, a via da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e a via da lipooxigenase (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) ou também através da via P450 epoxigenase. Os produtos da via da COX são os prostanóides (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub>) enquanto os produtos da via da LOX são os leucotrienos (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>) e lipoxinas.

A enzima ciclooxigenase (COX), também chamada de PG endoperóxido sintase, prostaglandina H sintase (PGHS) ou ácido graxo ciclooxigenase, é composta por duas enzimas distintas: a COX-1 e a COX-2, as quais originam as prostaglandinas (PGs), prostaciclina e os tromboxanos (TXs) (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; BURIAN; GEISSLINGER, 2005; PACHER *et al.*, 2007).

As prostaglandinas possuem diversos efeitos biológicos, dentre eles destacando-se a quimiotaxia de leucócitos, vasodilatação, efeito pirógeno, diferenciação de queratinócitos, quimiotaxia sobre neutrófilos e macrófagos. Outro efeito biológico é a influência sobre a angiogênese e a reepitelização. As prostaglandinas estimulam a migração e proliferação de

fibroblastos na fase de fibroplasia. A interação entre PGs, TXs e macrófagos é responsável pela proliferação endotelial. Da mesma forma que as PGs, os leucotrienos encontrados no exsudato inflamatório, podem causar agregação e adesão leucocitária ao endotélio vascular, além de terem uma poderosa ação quimiotática e o poder de aumentar a permeabilidade vascular (LEE *et al.*, 2003).

As ciclooxigenases transformam o ácido aracdônico em PGG<sub>2</sub> e esta em PGH<sub>2</sub> (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; BURIAN; GEISLINGER, 2005; PACHER *et al.*, 2007). A formação subsequente das prostaglandinas finais, a partir da PGH<sub>2</sub>, depende da presença de sintases específicas que produzem os prostanóides funcionalmente importantes PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e TXA<sub>2</sub>. Estas PGs podem sair da célula por transporte facilitado pelos transportadores de prostaglandinas (PGT) e outros carreadores, exercendo suas ações autócrinas ou parácrinas em uma família de receptores próprios, localizados nas membranas celulares. São eles: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> (EP<sub>1</sub> – 4), para a ligação da PGE<sub>2</sub>; DP<sub>1</sub> – 2, para a PGD<sub>2</sub>; receptor FP, para a PGF<sub>2</sub>; IP para a PGI<sub>2</sub>; e TPa e TPh, para o TXA<sub>2</sub> (BURIAN; GEISLINGER, 2005).

Na inflamação, as prostaglandinas, possuem diferentes efeitos. A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> promovem vasodilatação, causando aumento da permeabilidade vascular em sinergia com outros mediadores. Agem também sobre nociceptores polimodais, que são neurônios sensoriais periféricos que respondem aos estímulos nócicos (SAYAR; MELLI, 1999).

A PGE<sub>2</sub> está envolvida no desenvolvimento da febre e dor durante a inflamação. Essa PG sensibiliza os neurônios aferentes primários tornando-os mais responsivos ou sensíveis a estímulos álgicos como a bradicinina.

As lipooxigenases (LOX) formam uma família de enzimas citosólicas cujos produtos iniciais derivados do AA, são gerados por 3 enzimas que só estão presentes em alguns tipos de células, esses metabólitos são denominados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). Assim as plaquetas possuem apenas a 12-LOX e sintetizam o 12-HPETE, e os leucócitos têm tanto a 12-LOX, como a 5-LOX, e sintetizam o 12-HPETE e o 5-HPETE, que é quimiotático para neutrófilos. Os HPETE, semelhante às PGG e PGH, são intermediários instáveis que sofrem metabolização enzimática (MORROW; ROBERTS II, 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

Os leucotrienos, assim como as PGs, têm ação vasodilatadora e edematogênica (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; ALLER *et al.*, 2006;). Em especial os cisteinil-leucotrienos, LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>, causam intensa vasoconstrição e broncoespasmo e constituem o material originalmente conhecido como “substância de reação lenta da anafilaxia” (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; MORROW; ROBERTS II, 2003; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; KUMAR *et al.*, 2005). Os LT, em especial o LTB<sub>4</sub>, também ativam as respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais (NATHAN, 2002; KUMAR *et al.*, 2005), além da potente atividade quimiotática (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

As ações pró-inflamatórias de inúmeras prostaglandinas e leucotrienos são contidas/reguladas, por uma classe de moléculas chamadas lipoxinas (LX). As LX são uma classe de eicosanóides oxidados que se ligam a receptores celulares e bloqueiam o influxo de neutrófilos (NATHAN, 2002). Estas moléculas são geradas pela ação combinada de leucócitos, principalmente neutrófilos, e plaquetas (DYKE; SERHAN, 2003; GILROY *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

### **- Citocinas**

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos que regulam a atividade celular, principalmente do sistema imune. Incluem as interleucinas (IL), linfocinas, interferons e fator de necrose tumoral (TNF). (TYSON *et al.*, 2001)

Os monócitos e os linfócitos T ativados secretam várias citocinas, como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon  $\gamma$ , que estimulam as células endoteliais e os fibroblastos a secretar fatores estimuladores de colônias, que por sua vez, ativam os neutrófilos (KITAGAWA *et al.*, 1988). As principais citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) e o TNF- $\alpha$  (GRELLNER, 2002).

Com essa ativação, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 são secretados em grandes quantidades principalmente pelos macrófagos e aparecem na circulação em uma hora. Eles têm tanto efeitos locais como sistêmicos. Acredita-se que o TNF- $\alpha$ , anteriormente conhecido como

caquetina, seja o responsável pela caquexia ou emagrecimento observado em doenças inflamatórias crônicas e câncer (WAGNER; ROTH, 2000; ALWANI *et al.*, 2006).

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzido por outras células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e mastócitos) ou não inflamatórias (endotélio). É produzido em resposta a muitos estímulos extracelulares como outras citocinas, choque térmico, isquemia, luz UV e infecções microbianas. A ação destes estímulos é transmitida intracelularmente através dos membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que levam à síntese de TNF, dentre outras citocinas (ALWANI *et al.*, 2006). O TNF- $\alpha$  exerce potentes efeitos inflamatórios: induz a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (LAMPINEM *et al.*, 2004; CUZZOCREA, 2005; KUMAR *et al.*, 2005; ALWANI *et al.*, 2006); é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares; serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004); aumenta a permeabilidade vascular; promove a liberação do fator nuclear-kB (NF-kB) no citosol (BURIAN; GEISLINGER, 2005; KUMAR *et al.*, 2005; ALWANI *et al.*, 2006). A liberação sistêmica de TNF- $\alpha$  pode, entretanto, precipitar uma cascata destrutiva de eventos que podem resultar em lesão tecidual, disfunção orgânica e, potencialmente, morte. Entre seus efeitos sistêmicos está a indução de febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação, supressão miocárdica, indução de vasodilatadores sistêmicos com conseqüente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-1 é um potente mediador da inflamação e febre (WAGNER; ROTH, 2000). Possui quatro membros que são produzidos de forma semelhante ao TNF- $\alpha$  (IL-1a, IL-1b, IL-1Ra e IL-18) (ALWANI *et al.*, 2006). Seus efeitos fisiológicos são, essencialmente, idênticos aos do TNF- $\alpha$  (WAGNER; ROTH, 2000; SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004; ALWANI *et al.*, 2006), entretanto, a IL-1 não induz, por si só, lesão tecidual ou morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- $\alpha$  (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

#### **- Fator ativador de plaquetas**

Fator ativador de plaquetas (PAF), o PAF é um fosfoglicerídeo acetilado derivado dos lipídeos das membranas celulares e é produzido pelas células endoteliais, plaquetas, PMN e



macrófagos, sendo um importante agregante plaquetário (WAGNER; ROTH, 2000; KUMAR *et al.*, 2005). O PAF possui ações em várias células-alvo e não somente em plaquetas. Também é capaz de estimular a quimiotaxia pra neutrófilos e monócitos, a degranulação e a produção de espécies reativas de oxigênio (COUSSENS; WERB, 2002). O PAF pode ser importante ao mediar o processo de adesão, por exemplo, quando derivado de células endoteliais pode estar localizado em sua superfície, onde tem acesso aos receptores de PAF nos PMN em rolamento. Pode ativar a fosfolipase A2 para a produção de eicosanóides a partir de fosfolipídeos. (WAGNER; ROTH, 2000).

### **- Bradicinina**

É um importante mediador no processo inflamatório, visto que desempenha ações pró-inflamatórias. Ela é liberada após traumas e processos inflamatórios, o que promove o relaxamento das arteríolas e constrição das vênulas, gerando um aumento da permeabilidade microvascular e conseqüentemente aumento do extravasamento plasmático para o foco inflamatório (KAPLAN *et al.*, 1998; PESQUERO *et al.*, 2000; COUTURE *et al.*, 2001).

A maioria dos efeitos pró-inflamatórios da BK são mediados pela ativação do seu receptor B2 (SALEH *et al.*, 1998), embora existam estudos demonstrando que a ativação do receptor B1 da BK também está envolvido no aumento da exsudação e da permeabilidade vascular como foi demonstrado por Vianna e Calixto (1998) e Hayashi *et al.* (2002), no modelo da pleurisia induzida pela BK, em camundongos e em ratos, respectivamente.

#### 1.2.4 Relevância e Justificativa

A riparina I, um análogo estrutural da riparina II apresentou efeitos antinociceptivos em camundongos (ARAUJO *et al.*, 2009). Já a riparina III, uma substância oriunda da mesma planta, demonstrou apresentar potente atividade relaxante do músculo liso, inibindo contrações induzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia, como também foi capaz de inibir contrações induzidas por ocitocina e bradicinina em útero de ratas virgens (CASTELO-BRANCO *et al.*, 1991; CASTELO-BRANCO, 1992).

Como riparina III foi capaz de antagonizar alguns mediadores inflamatórios, torna-se relevante a investigação do potencial farmacológico de riparina II em modelos clássicos de nocicepção e inflamação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o potencial farmacológico da riparina II em modelos animais de nocicepção e inflamação.

### **2.2 Específicos**

Avaliar o potencial antinociceptivo da riparina II e mecanismos envolvidos utilizando os modelos animais de:

- Contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e placa quente em camundongos;
- Testes de nocicepção induzida por capsaicina e glutamato;

Investigar o potencial antiinflamatório da riparina II e mecanismos envolvidos nos modelos animais de:

- Edema de pata induzido por carragenina, dextrano, histamina, serotonina e bradicinina em ratos;
- Determinação da migração de leucócitos induzida por estímulo inflamatório direto (fMLP) e indireto (carragenina); atividade da mieloperoxidase e extravasamento de proteínas no modelo de peritonite induzida por carragenina;
- Determinação da concentração de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  no fluido peritoneal de ratos;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Botânico

A planta *Aniba riparia* (Nees) Mez foi identificada pelo botânico Klaus Kubitzki da Universidade de Hamburgo/Alemanha (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). O fruto verde de *Aniba riparia* (material botânico) foi coletado na região de Humaitá, estado do Amazonas, Brasil (BARBOSA FILHO *et al.*, 1987). O material foi cedido ao Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, e a extração e isolamento foram feitos pelo Prof. Dr. Stanley Juan Chávez Gutierrez da Universidade Federal do Piauí, conforme descrito abaixo.

#### 3.2 Extração e Isolamento

As frutas verdes (5 kg) foram moídas, extraídas em etanol e a solução foi então filtrada, sendo o filtrado evaporado. O resíduo (380 g) foi dissolvido novamente numa solução aquosa de etanol 60%. A solução foi extraída primeiramente com hexano e depois com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>). Os solventes foram evaporados e o extrato hexânico (88 g) foi cristalizado com metanol dando triglicérides (79 g). A água mãe foi evaporada e o resíduo foi submetido a cromatografia (sílica gel). A eluição com solvente de polaridade crescente deu na ordem benzilbenzoatos (1 g) e sitosterol (75 mg). O extrato de CHCl<sub>3</sub> (59 g) foi cristalizado com benzeno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>). A água mãe foi evaporada e o resíduo tratado da mesma maneira produziu na ordem riparina III (3 g), riparina II (427 mg) e riparina I (305 mg), entre outros compostos (BARBOSA FILHO *et al.*, 1987).

#### 3.3 Drogas e Reagentes

- Ácido Acético Glacial P.A. (Vetec®, Brasil)
- Água Destilada (Deionizador)
- Formaldeído P.A. (Reagen®, Brasil)
- Sulfato de Morfina (Cristália®, Brasil)
- Indometacina (Sigma®, U.S.A)
- Capsaicina (Sigma®, U.S.A)

- Vermelho de Rutênio (Aldrich, U.S.A)
- Carragenina ( $\lambda$ ) (Sigma®, U.S.A)
- Dextrano (Sigma®, U.S.A)
- Histamina (Sigma®, U.S.A)
- Serotonina (Sigma®, U.S.A)
- Bradicinina (Sigma®, U.S.A)
- Heparina (ampolas de 5.000 UI/mL; HEPARIN®) (Cristália®, Brasil)
- N-Formil-Metil-L-Metionil-L-Fenilalanina (fMLP) (Sigma®, U.S.A)
- Tween 80- Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate (Sigma®, U.S.A)
- Albumina sérica bovina (Sigma®, U.S.A)
- Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma®, U.S.A)
- Hidrocloridrato de o-dianisidine (Sigma®, U.S.A)
- Peróxido de Hidrogênio (Vetec®, Brasil)
- Reagente de Folin (QEEL®, Brasil)
- Dexametasona (Decadron®) (Promode Química Farmacêutica, Brasil)

### **3.4 Equipamentos e Materiais**

- Balança Analítica (Modelo H5, Mettler, Suíça)
- Balança para animais (Filizola®, Brasil)
- Cronômetros (Incoterm®, Brasil)
- Pipetas automáticas (H.E., Dinamarca)
- Placa Quente (mod. DS37) (Ugo Basile®, Itália)
- Pletismógrafo (mod. 7150) (Ugo Basile®, Itália)
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025 mm<sup>2</sup>)

- Material Cirúrgico
- Seringas Plásticas (BD® Plastipak)
- Espectrofotômetro com medidor de absorvância digital (Modelo Beckman®, USA)
- Medidor de pH modelo B374 (Micronal®, Brasil)
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha)
- Alicates para deslocamento cervical
- Lâminas e lamínulas para microscopia
- Centrífuga refrigerada- Mod. 5500 DR (Cientec®, Brasil)
- Microscópio óptico- Mod. YS2 T (Nikon®, Japão)
- Estufa de secagem e esterilização- Mod. 315 SE (Fanem®, Brasil)

### **3.5 Animais Experimentais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 e 35 gramas, nos experimentos de nocicepção. Para os demais experimentos, foram utilizados Ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) pesando entre 180 - 250 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em caixas de prolipopileno a temperatura média de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 8-12 horas, antes da realização dos experimentos em que a via oral era utilizada.

Todos os protocolos envolvendo a utilização de animais realizados nesse trabalho seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), respeitando a legislação vigente e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 40/10).

### 3.6 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

#### 3.6.1 Teste das Contorções Abdominais induzidas por Ácido Acético

Camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada; v.o.) ou riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.). Indometacina (5 mg/kg; v.o.) foi usada como droga de referência. Após 60 minutos (v.o.), os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6 % (10 mg/Kg). Decorridos 10 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi determinado, para cada animal por um período de 20 minutos. Uma contorção deve ser identificada como uma extensão das patas traseiras, acompanhada de constrição do abdômen (KOSTER *et al.*, 1959).

#### 3.6.2 Teste da Placa Quente

Camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos, foram pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a uma temperatura de  $51 \pm 0,5$  °C. Aqueles que mostraram tempo de reação (saltar ou lambe as patas) superior a 20 segundos foram descartados. Durante o teste, o tempo de reação foi registrado antes (0 min) e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de riparina II (25 e 50 mg/Kg; v.o.), morfina (7,5 mg/Kg; i.p.) e veículo (3% de Tween 80 em água destilada). Um tempo de 30 segundos foi considerado como tempo máximo de reação para prevenir danos as patas dos animais (EDDY; LEIMBACH, 1953).

#### 3.6.3 Teste da Formalina

Camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada; v.o.) e riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.). Morfina (7,5 mg/kg; i.p.) foi usada como droga de referência. Após 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 1% na pata direita traseira (20 µL). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0 – 5 min (1ª Fase) e 20 – 25 min (2ª Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

### 3.6.4 Teste da Nocicepção induzida por Capsaicina

Camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada; v. o.), riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.) ou vermelho de rutênio (3 mg/kg; i. p.). A nocicepção foi induzida na pata direita traseira pela administração de 20 µL de capsaicina (2,2 µg) e o tempo de lambedura foi registrado, em segundos, durante um período de 5 minutos após a injeção do estímulo (SAKURADA *et al.*, 2003).

### 3.6.5 Teste da Nocicepção induzida por Glutamato

Camundongos *Swiss* machos, divididos em três grupos de animais, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada; v.o.) e riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.). A nocicepção foi induzida pela administração na superfície ventral da pata direita traseira de 20 µL de uma solução de glutamato (10 µmol/pata, preparada em solução salina). Os animais foram observados por 15 minutos, a partir da injeção da solução de glutamato, e o tempo gasto pelo animal lambendo a pata foi registrado em cronômetro (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

## 3.7 Avaliação da Atividade Antiinflamatória

### 3.7.1 Edema de Pata induzido por Carragenina

Ratos *Wistar* machos, divididos em quatro grupos, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada; v.o.), riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.) ou indometacina (10 mg/kg; v.o.). Após 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais recebem uma injeção intraplantar de carragenina 1% (100 µL) para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos 1h, 2h, 3h, 4h e 24h após a administração da carragenina (WINTER *et al.*, 1962).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália) onde a pata posterior direita do animal foi submergida, até a junção tíbiotarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado e considerado o volume da pata. Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção da carragenina.



### 3.7.2 Edema de Pata induzido por Dextrano

Ratos *Wistar* machos, divididos em 4 grupos, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada; v. o.), riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.) ou ciproeptadina (10 mg/kg; v.o.). Após 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais recebem uma injeção intraplantar de dextrano 1,5 % para indução do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos 1h, 2h, 3h e 4h após a administração do dextrano (HENRIQUE *et al.*, 1987).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado através de um Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália) onde a pata posterior direita do animal foi submergida, até a junção tíbiotarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado e considerado o volume da pata. Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção do dextrano.

### 3.7.3 Edema de Pata induzido por Histamina, Serotonina e Bradicinina em ratos

Os testes foram realizados segundo estudos anteriores (PARRATT; WEST, 1958). Ratos *Wistar* machos foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada; v. o.) ou riparina II (25 e 50 mg/kg; v. o.). Após 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de: histamina (200 µg/pata), serotonina (200 µg/pata) ou bradicinina (10 µg/pata) para indução do edema na pata direita traseira. No modelo de edema de pata induzido por bradicinina, os animais foram pré-tratados 30 minutos antes com captopril (5 mg/kg; i.p.) para prevenir a degradação da bradicinina (CAMPOS; CALIXTO, 1995). O volume do edema (mL) foi determinado através de um Pletismógrafo (conforme descrito no item anterior) em vários intervalos de tempo após a injeção dos estímulos inflamatórios. No caso do edema de pata induzido por histamina foram realizadas medições em 15, 30, 60 e 90 minutos; para a serotonina os tempos foram 15, 30 e 60 minutos e para a bradicinina 15 e 30 minutos.

### 3.7.4 Peritonite induzida por agente quimiotático indireto (carragenina – Cg) e direto (fMLP)

Ratos *Wistar* machos, divididos em cinco grupos, foram tratados com veículo (3% de Tween 80 em água destilada; v. o.), riparina II (25 e 50 mg/kg; v. o.) ou dexametasona (5

mg/kg; v.o.). Após 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i. p.) de carragenina (Cg- 500  $\mu$ g/cavidade) ou fMLP (100 nmol) dissolvidos em 1 mL de salina estéril. Após 4 horas (h), foi avaliada a migração de leucócitos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi injetado na cavidade peritoneal 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Após leve massagem no abdômen, foram coletados com pipeta de Pasteur, 8 mL de fluido peritoneal (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991) (**Figura 4**). Uma amostra do lavado peritoneal (20  $\mu$ L) foi diluída em 380  $\mu$ L do reagente de Turk para contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer (SOUZA; FERREIRA, 1985).

A)



B)



**Figura 4: Coleta do fluido peritoneal em ratos.**

(A) Animal preparado para a coleta;

(B) Retirada do líquido peritoneal.

### 3.7.5 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no fluido peritoneal de ratos

A MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de polimorfonucleares (PMN) que migram para o local do estímulo inflamatório. As amostras do fluido peritoneal coletadas (100  $\mu$ L) foram homogeneizadas em uma solução de Brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50 mM pH 6.0 (900  $\mu$ L). As

amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm numa temperatura de 4° C por 15 minutos para remover o material insolúvel. A MPO contida no sobrenadante (0,1 mL) foi analisada espectrofotometricamente após a adição de 2,9 ml de tampão fosfato (50 mM pH-6) contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\theta$ -dianisidine e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. As cinéticas de mudança na absorbância a 470 nm foram medidas no tempo 0 e 5 minutos (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

### 3.7.6 Determinação do conteúdo de proteínas no fluido peritoneal de ratos

A quantidade de proteína foi determinada utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau, que produz uma cor verde azulada que é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em 750 nm e os valores obtidos foram comparados à curva padrão de albumina.

Foram utilizados os seguintes reagentes no procedimento experimental:

- Reagente A (Solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2% em NaOH 0,1 N);
- Reagente B (Solução de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 0,5% em  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 1%);
- Reagente C (Mistura de 24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar);
- Reagente de Folin (Ciocalteau-Fenol 1:1 em água bidestilada);
- Solução de albumina sérica bovina (1 mg/mL em água bidestilada)

### 3.7.7 Avaliação da concentração de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ e no fluido peritoneal

As quantificações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram realizadas utilizando-se kits de ELISA para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  de ratos (GE Healthcare®) no fluido peritoneal. O procedimento foi realizado

de acordo com as instruções do fabricante e os resultados foram expressos em pg/mL de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  com base na curva padrão obtida.

### **3.8 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa Graph Pad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (E.P.M.) com o número de animais entre parênteses e considerou-se estatisticamente significativa a partir do valor de  $p < 0,05$ .

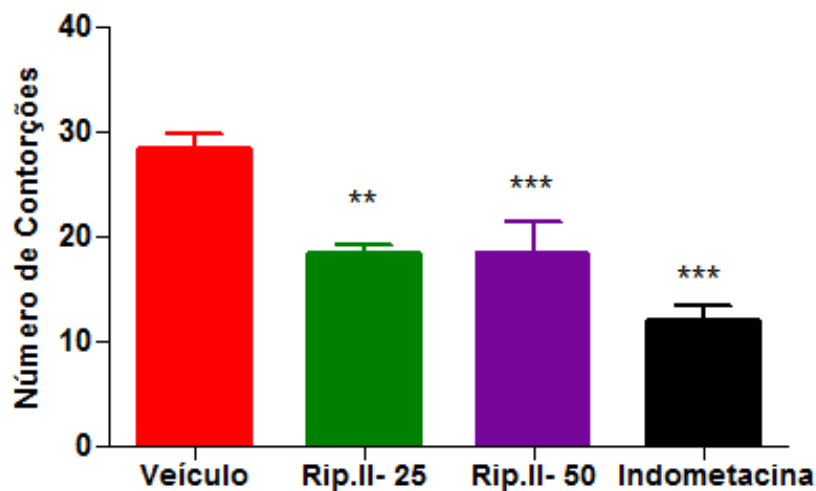
Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), utilizando como testes *post hoc* Student-Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns, conforme o tipo dos dados analisados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

#### 4.1.1 Efeito da riparina II nas Contorções Abdominais induzidas por Ácido Acético em camundongos

A administração oral de riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético [Rip.II-25:  $18,38 \pm 0,8647$  (8),  $p < 0,01$ ; Rip.II-50:  $18,50 \pm 2,928$  (8),  $p < 0,001$ ], em relação ao veículo [ $28,38 \pm 1,546$  (8)]. O grupo de animais pré-tratados com indometacina 10 mg/kg, v.o., um anti-inflamatório não esteróide usado como droga de referência, representou uma redução significativa do número de contorções abdominais [ $12,08 \pm 1,323$  (13),  $p < 0,001$ ]. Os resultados são mostrados na **Figura 5**.



**Figura 5. Efeito da administração oral de riparina II e indometacina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.**

Riparina II (25 e 50 mg/kg), Veículo (3% de Tween em água destilada) e Indometacina foram administrados 60 min. antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

#### 4.1.2 Efeito da riparina II no Teste da Placa Quente em camundongos

A riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg não modificou o tempo de reação a placa quente ( $51 \pm 5^\circ\text{C}$ ) em nenhum dos intervalos de tempo pré estabelecidos quando comparado ao veículo (**Tabela 2**), diferente da morfina (7,5 mg/kg), usada como droga de referência que promoveu um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) no tempo de reação em todos os tempos observados em relação ao grupo tratado apenas com o veículo.

**Tabela 2. Efeito da riparina II (25 e 50 mg/kg) e morfina (7,5 mg/kg) no teste da placa quente em camundongos**

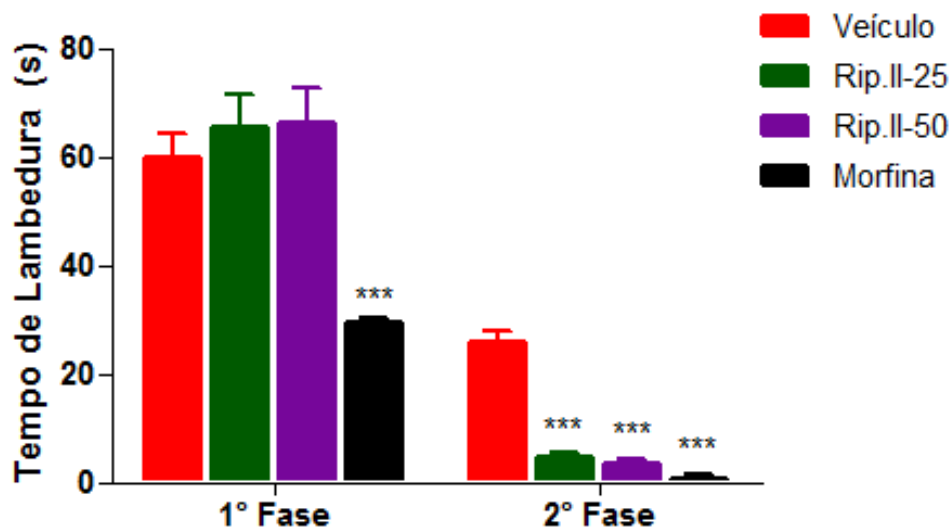
Grupo	Tempo de Resposta ao estímulo				
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle	13,13 $\pm$ 1,176	7,557 $\pm$ 0,936	3,957 $\pm$ 0,805	2,843 $\pm$ 0,382	19,94 $\pm$ 1,865
Rip. II-25	7,625 $\pm$ 0,807	10,07 $\pm$ 1,264	5,829 $\pm$ 0,740	4,600 $\pm$ 0,842	15,89 $\pm$ 1,337
Rip. II-50	11,10 $\pm$ 1,628	8,375 $\pm$ 1,808	8,200 $\pm$ 2,362	4,271 $\pm$ 0,873	15,46 $\pm$ 1,362
Morfina	19,23 $\pm$ 1,024 ***	33,76 $\pm$ 4,283 ***	20,75 $\pm$ 2,631 ***	23,32 $\pm$ 2,625 ***	30,48 $\pm$ 2,449 ***

Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de reação ao estímulo térmico. A resposta consiste em saltar ou lambe a pata direita traseira após serem colocados na placa quente. O tempo de reação dos animais a placa quente foi avaliado antes e 30, 60, 90 e 120 min. após os tratamentos. Foram utilizados 8 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle (ANOVA e Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.3 Efeito da riparina II na Nocicepção induzida por Formalina em camundongos

A **Figura 6** mostra que a administração oral de riparina II nas doses de 25 mg/kg [ $65,50 \pm 6,135$  (8)] e 50 mg/kg [ $66,25 \pm 6,466$  (8)], não foi capaz de reduzir o comportamento do animal de lambe a pata injetada com formalina durante a primeira fase do teste (0 - 5 minutos) em relação ao veículo [ $59,91 \pm 4,261$  (11)].

Em relação à segunda fase do teste (20 - 25 minutos), a riparina II nas doses de 25 mg/kg [ $4,625 \pm 1,017$  (8),  $p < 0,001$ ] e 50 mg/kg [ $3,375 \pm 0,8224$  (8),  $p < 0,001$ ] foi capaz de promover uma redução significativa do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata em relação ao veículo [ $17,64 \pm 1,625$  (11)]. A morfina (7,5 mg/kg; i.p.), um analgésico opióide, foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambedura da pata tanto na primeira como na segunda fase do teste [1ª fase:  $29,57 \pm 1,152$  (7),  $p < 0,001$ ; 2ª fase:  $1,000 \pm 0,7237$  (7),  $p < 0,001$ ].

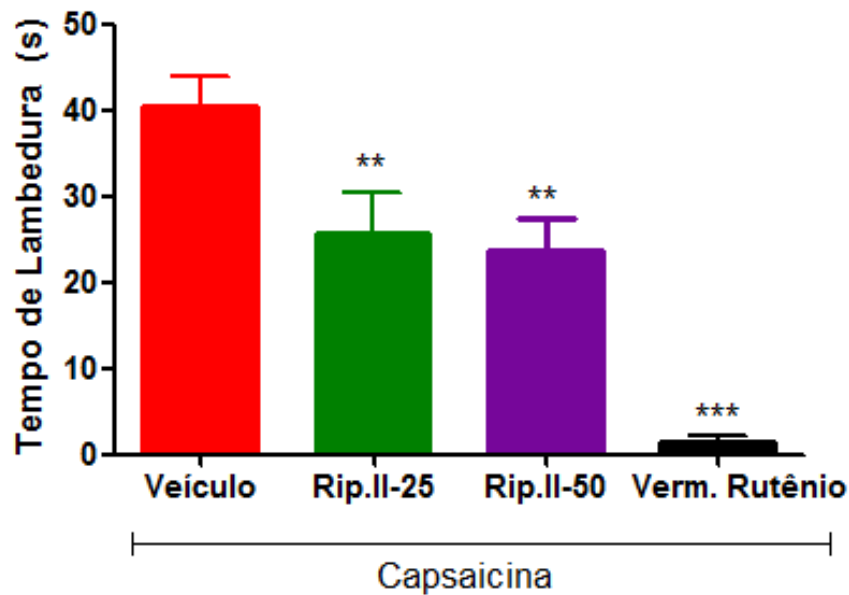


**Figura 6. Efeito da riparina II e morfina sobre o tempo de lambedura (s) da pata direita traseira na primeira (0 - 5 minutos) e segunda fase (20 - 25 minutos) do teste da nocicepção induzida pela formalina.**

Riparina II (25 e 50 mg/kg) e Veículo (3% de Tween em água destilada) foram administrados 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 1%. Um grupo recebeu Morfina (7,5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de formalina 1%. Os valores no gráfico representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambedura da pata após a aplicação da formalina na pata direita traseira. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA e Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.4 Efeito da riparina II na Nocicepção induzida pela Capsaicina em camundongos

Riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração intraplantar de capsaicina [Rip.II-25:  $25,75 \pm 4,647$  (8); Rip.II-50:  $23,75 \pm 3,878$  (7)] em relação ao Veículo [ $40,36 \pm 3,483$  (11)]. O vermelho de rutênio (3 mg/kg), utilizado como droga de referência, reduziu significativamente [ $1,375 \pm 0,843$  (8);  $p < 0,001$ ] o tempo de lambedura da pata quando comparado ao veículo. (**Figura 7**)



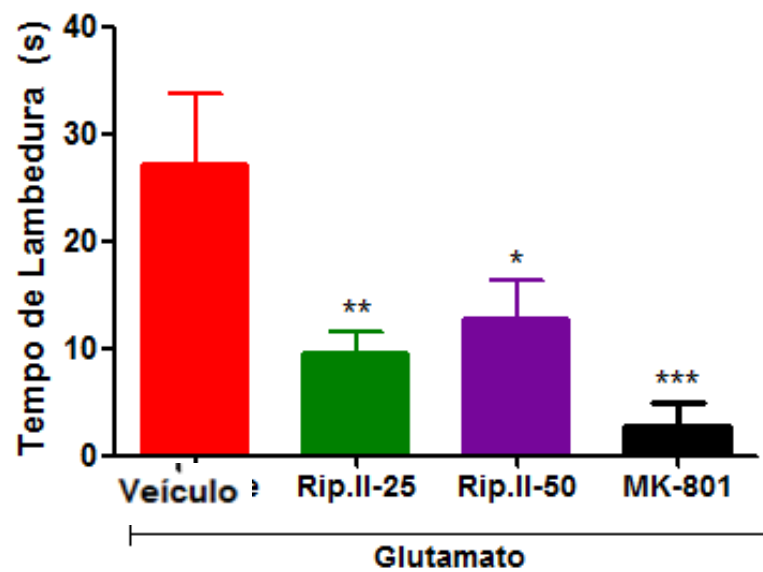
**Figura 7. Efeito da riparina II no teste da capsaicina em camundongos.**

Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes, e vermelho de rutênio 30 minutos antes da capsaicina. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo que o animal lambe a pata em segundos (s), durante 5 minutos. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).



#### 4.1.5 Efeito da riparina II na Nociceção induzida por Glutamato em camundongos

Riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o tempo de lambedura da pata, após a administração intraplantar de glutamato [Rip.II-25:  $9,571 \pm 2,057$  (7); Rip.II-50:  $12,67 \pm 3,676$  (6)] ao em relação ao veículo [ $27,17 \pm 6,549$  (6)]. (**Figura 8**).



**Figura 8. Efeito da riparina II no teste da nociceção induzida por glutamato em camundongos.**

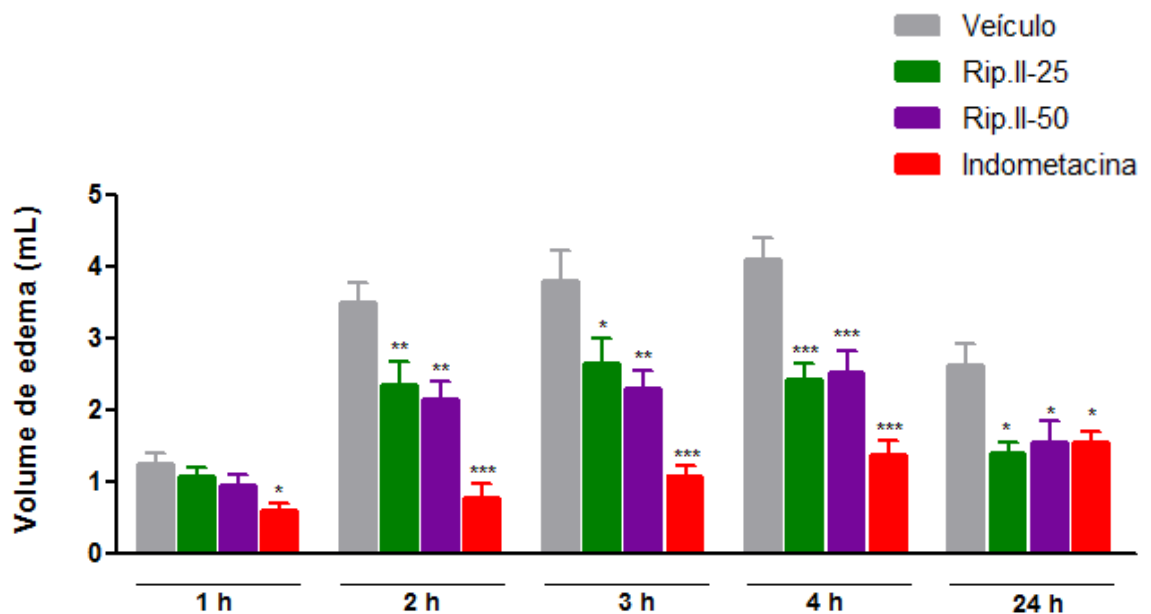
Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg), MK-801 foram administrados 60 minutos antes do glutamato. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambedura da pata (s), durante 15 minutos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).

## 4.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória

### 4.2.1 Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Carragenina em ratos.

A Riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina após a segunda hora da aplicação do estímulo quando comparado ao veículo. (**Figura 9**).

A indometacina, antiinflamatório não esteróide, usado como droga de referência, reduziu de forma significativa o tamanho do edema de pata em todos os períodos observados, quando comparado ao veículo.



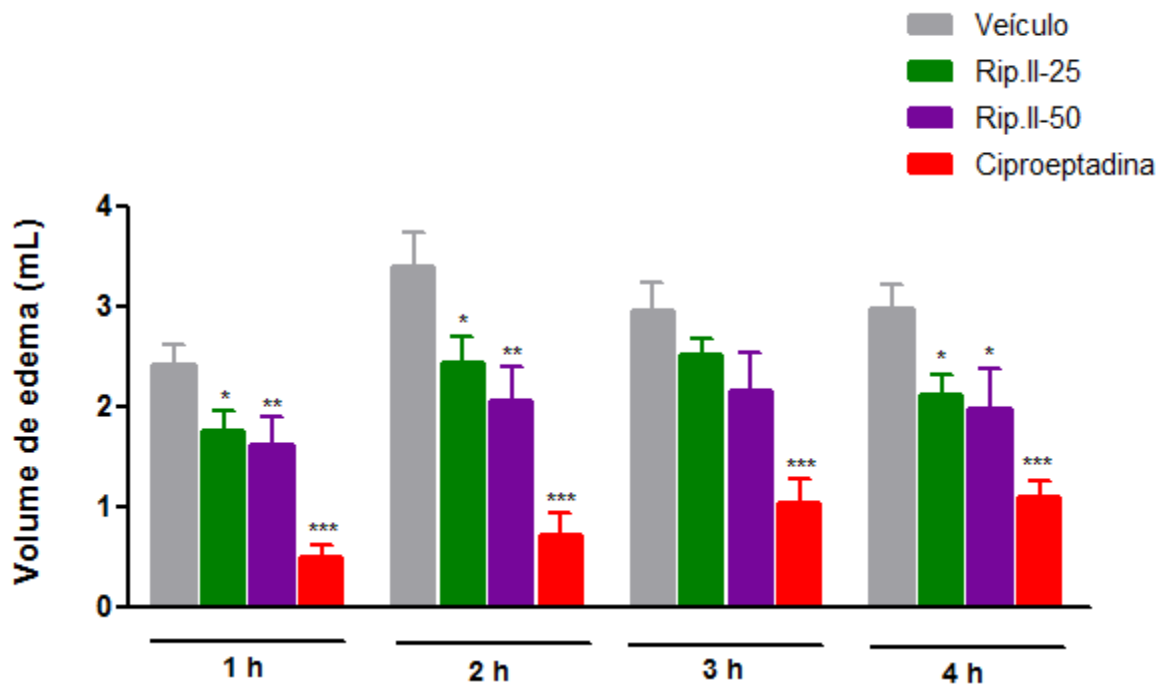
**Figura 9. Efeito da riparina II no edema de pata induzido por carragenina em ratos.**

Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do volume do edema. O edema foi expresso em mL, pela diferença entre a medida da pata nos tempos 1, 2, 3, 4 e 24h e a medida no tempo 0 (antes da carragenina). Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes da indução do edema por carragenina a 1%. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.2 Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Dextrano em ratos.

A Riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral, foi capaz de reduzir o edema induzido por dextrano nos tempos 1, 2 e 4 horas após a aplicação do dextrano quando comparado ao veículo. (**Figura 10**).

Ciproeptadina (10 mg/kg; v.o.), antagonista H1 e 5-HT, reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o edema de pata em todos os períodos observados quando comparado com o veículo.



**Figura 10. Efeito da riparina II no edema de pata induzido por dextrano em ratos.**

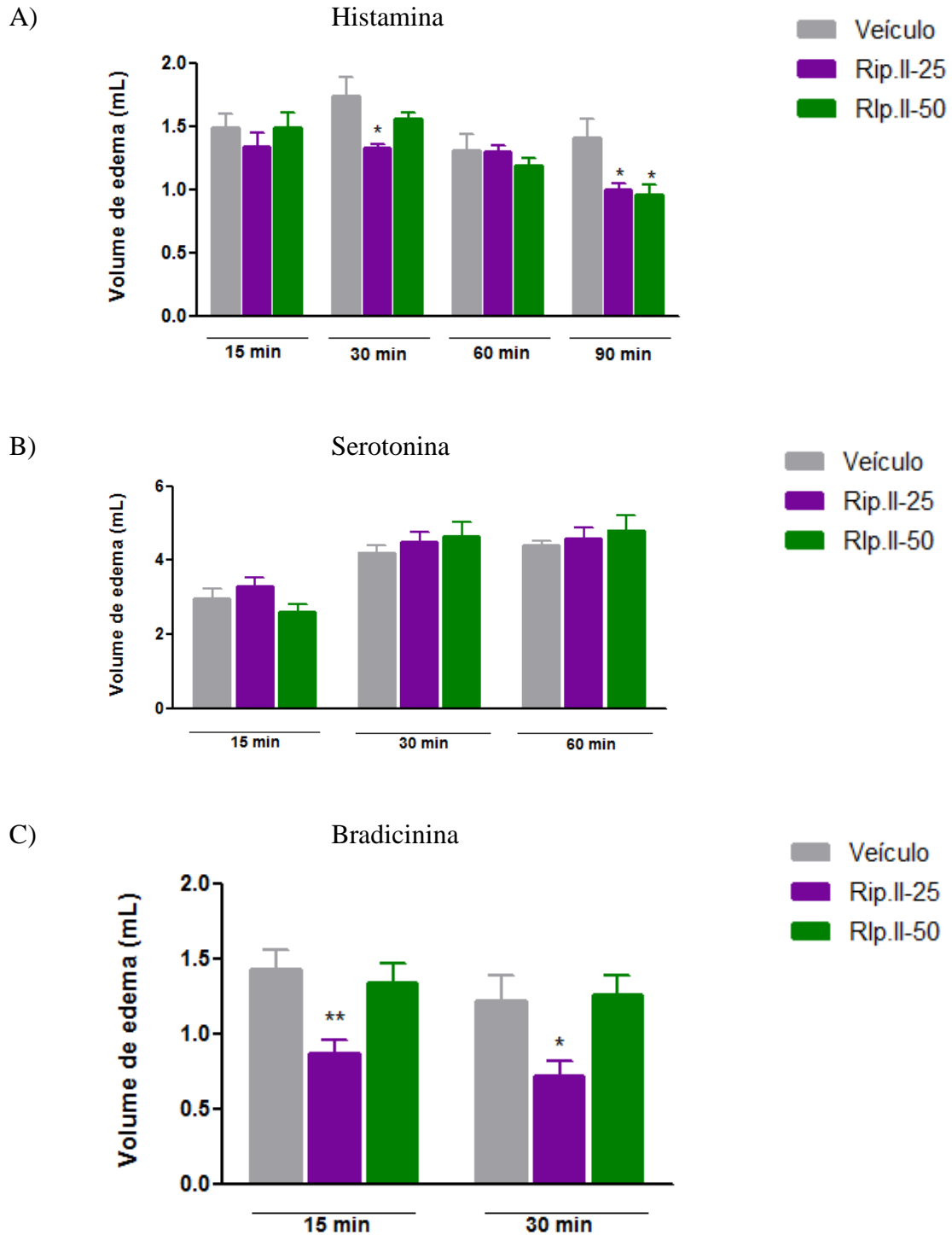
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. do volume do edema. O edema foi expresso em mL, pela diferença entre a medida da pata nos tempos 1, 2, 3 e 4h e a medida no tempo 0 (antes do dextrano). Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg; v. o.) e ciproeptadina (10 mg/kg; v.o.) foram administrados 60 minutos antes da indução do edema por dextrano a 1,5%. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.3 Efeito da riparina II no modelo de Edema de Pata induzido por Histamina, Serotonina e Bradicinina em ratos

A riparina II, na dose de 25 mg/kg, por via oral, foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema induzido por histamina (200  $\mu\text{g/pata}$ ) nos tempos de 30 e 90 minutos quando comparado ao veículo. A riparina II na dose de 50 mg/kg, também por via oral, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o edema somente no tempo de 90 minutos (**Figura 11A**).

A riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral, não foi capaz de reduzir significativamente o volume do edema induzido por serotonina em nenhum dos tempos estabelecidos, quando comparado ao veículo. Isso demonstra que a riparina II não é efetiva em reduzir o edema induzido por serotonina (**Figura 11B**).

Em relação ao edema induzido por bradicinina, a riparina II na dose de 25 mg/kg, por via oral, foi capaz de reduzir significativamente o volume do edema em todos os períodos observados quando comparado com o veículo. E a riparina II na dose de 50 mg/kg não foi eficaz em reduzir o edema induzido por bradicinina (**Figura 11C**).



**Figura 11. Efeito da riparina II no edema de pata induzido por histamina, serotonina e bradicinina.**

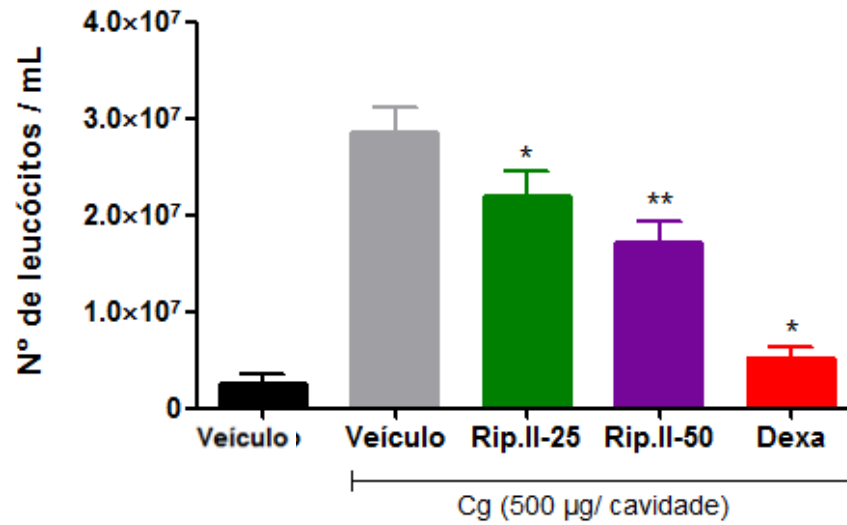
Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. do volume do edema. Veículo (3% de Tween em água destilada) e riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.) foram administrados 60 minutos antes da indução do edema por histamina (200  $\mu$ g/pata), serotonina (200  $\mu$ g/pata) e bradicinina (10  $\mu$ g/pata). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.4 Peritonite induzida por Carragenina (Cg) ou fMLP em ratos

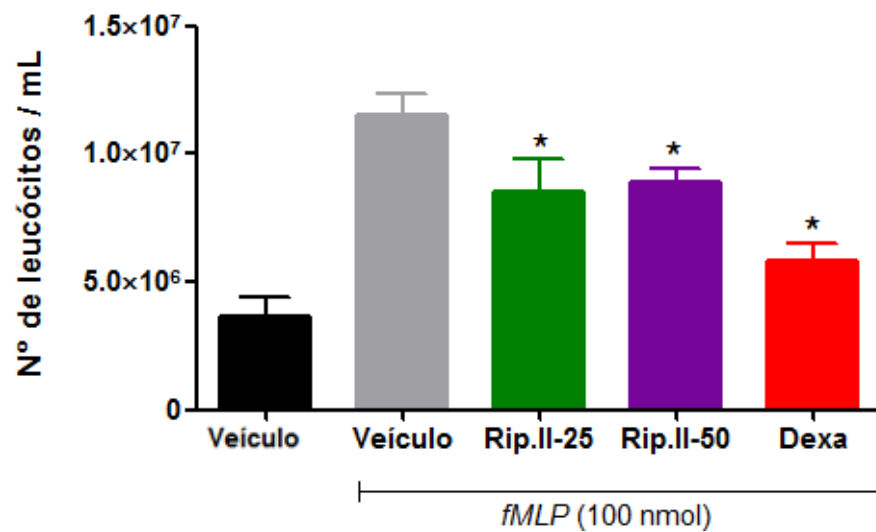
Os efeitos da riparina II sobre a migração de leucócitos induzido por carragenina estão representados na **Figura 12**. A administração de carragenina promoveu um aumento do número de leucócitos totais  $2,86 \times 10^7$  e o pré-tratamento por via oral com a riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu de forma significativa o número de leucócitos correspondendo a uma inibição em média de 23,58% e 39,92%, respectivamente. A dexametasona (5 mg/kg; v.o.), utilizada como droga de referência, diminuiu em 81,80% o infiltrado celular em relação ao veículo.

A administração de fMLP promoveu um aumento no número de leucócitos totais  $1,15 \times 10^7$  em relação ao grupo tratado apenas com salina  $3,63 \times 10^6$ . O pré-tratamento com riparina II (25 e 50 mg/kg; v.o.) foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a migração de leucócitos, correspondendo a uma inibição de 26,21% e 22,52%, respectivamente. A dexametasona (5 mg/kg; v.o.), utilizada como droga de referência, reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) o infiltrado celular em 49,18%.

A)



B)



**Figura 12. Efeito da riparina II sobre a migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina e por fMLP na cavidade peritoneal de ratos.**

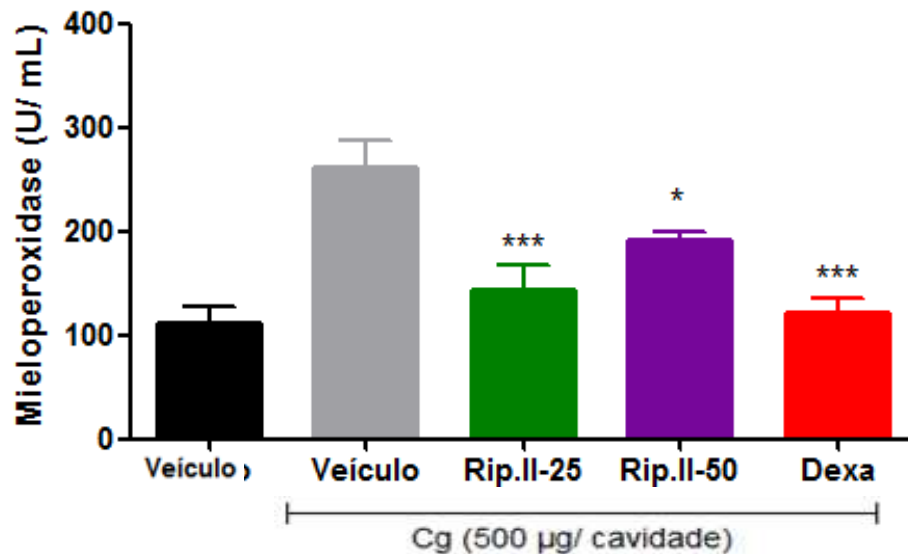
Salina, Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg) e dexametasona foram administradas 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de carragenina (500 µg/cavidade) ou fMLP (100 µmol). Salina compreende o grupo de animais não tratados com carragenina. Os valores representam média ± E.P.M. do número de leucócitos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Veículo. (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.5 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) no fluido peritoneal de ratos

A injeção intraperitoneal de 1 mL de solução de carragenina (500 µg/cavidade) produziu um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos, quando comparado com os valores de animais tratados apenas com salina [Veículo:  $260,5 \pm 25,98$  (5); Sadio:  $111,8 \pm 15,95$  (6)].

Riparina II, nas doses de 25 e 50 mg/kg foi capaz de reduzir de forma significativa a atividade da MPO quando comparado ao veículo em média 49,95 % e 26,44%, respectivamente [Rip.II-25:  $143,4 \pm 23,93$  (6)  $p < 0,001$ ; Rip.II-50:  $191,6 \pm 7,305$  (6)  $p < 0,05$ ]. A dexametasona, utilizada como droga de referência, também reduziu a atividade da MPO quando comparado ao veículo em média 53,05%. [Dexametasona:  $122 \pm 13,95$  (8);  $p < 0,001$ ].

(Figura 13)



**Figura 13. Efeito da riparina II sobre a atividade da mieloperoxidase no fluido peritoneal de ratos.**

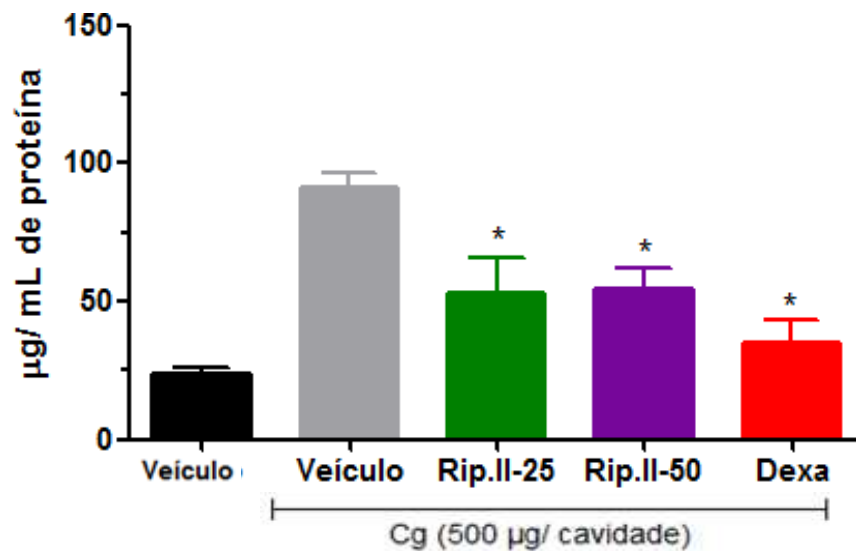
Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. para a atividade da MPO. A atividade da enzima foi medida em fluido peritoneal de animais submetidos a peritonite por carragenina. A dosagem foi realizada no fluido peritoneal coletado 4h após a aplicação da carragenina; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo. (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).



#### 4.2.6 Determinação do conteúdo de proteínas no fluido peritoneal de ratos

A riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) a concentração de proteínas no fluido peritoneal quando comparado ao veículo [Rip.II-25:  $53,31 \pm 12,12$  (5); Rip.II-50:  $54,45 \pm 7,764$  (5)], correspondendo a uma inibição de 41,6 e 40,36%, respectivamente.

A dexametasona, administrada oralmente, reduziu a quantidade de proteínas em 61,92% [Dexametasona:  $34,76 \pm 8,280$  (5)]. (**Figura 14**)



**Figura 14. Efeito da riparina II sobre a concentração de proteínas no fluido peritoneal de ratos com peritonite induzida por carragenina.**

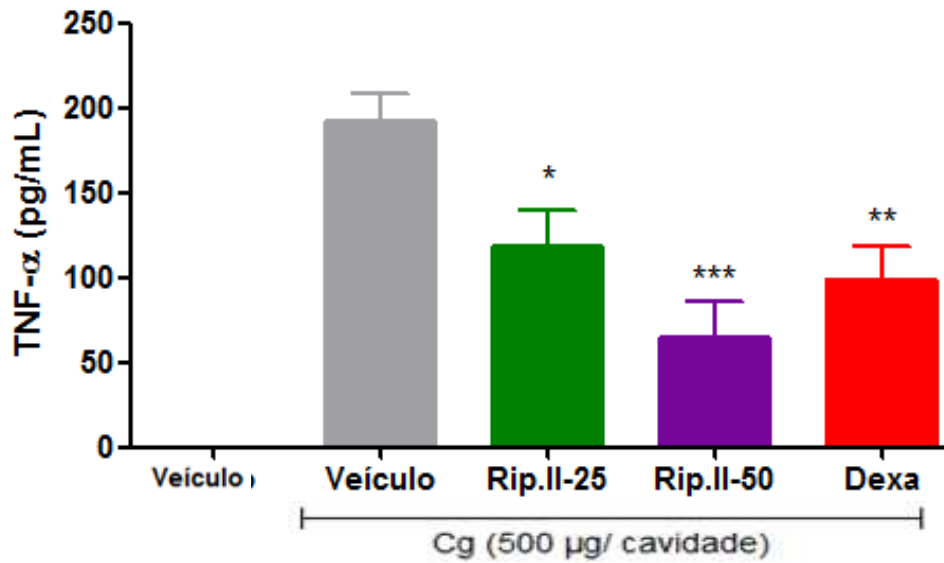
Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. para a concentração de proteínas. A quantidade de proteínas foi medida em fluido peritoneal de animais submetidos a peritonite por carragenina. A dosagem foi realizada no fluido peritoneal coletado 4h após a aplicação da carragenina. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  vs Veículo. (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.2.7 Avaliação da concentração de TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$ no fluido peritoneal de ratos

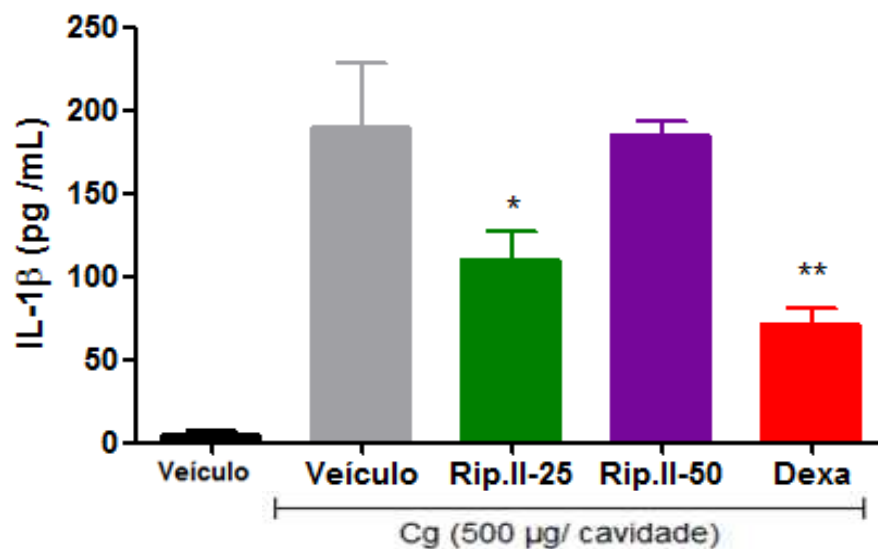
Em relação a concentração de TNF- $\alpha$ , a riparina II foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao veículo [Veículo:  $192,0 \pm 16,82$  (4); Rip.II-25:  $118,6 \pm 20,79$  (5); Rip.II-50:  $64,29 \pm 21,79$  (5)]. A dexametasona também reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) a concentração de TNF- $\alpha$  [Dexametasona:  $98,86 \pm 19,77$  (4)].

A riparina II, na dose de 25 mg/kg, v.o., foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de IL-1 $\beta$  quando comparado ao veículo [Veículo:  $189,6 \pm 38,23$  (4); Rip.II-25:  $110,1 \pm 16,68$  (4); Rip.II-50:  $185,1 \pm 8,77$  (4)]. A dexametasona também reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) a concentração de IL-1 $\beta$  [Dexametasona:  $71,40 \pm 9,952$  (5)].  
**(Figura 15)**

A)



B)



**Figura 15. Efeito da riparina II, por via oral, na concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no fluido peritoneal de ratos.**

Salina, Veículo (3% de Tween em água destilada), riparina II (25 e 50 mg/kg) e dexametasona foram administradas 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de carragenina (500  $\mu$ g/cavidade). Salina compreende o grupo de animais não tratados com carragenina. A dosagem foi realizada no fluido peritoneal coletado 4h após a aplicação da carragenina. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. \* $p$ < 0,05; \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ < 0,001 vs Veículo. (ANOVA seguido de Student Newman Keuls, *post hoc*).

## 5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, visto que são compostos por estruturas químicas privilegiadas, selecionadas por milhões de anos de evolução (CALIXTO, 2005). Dos fármacos disponíveis na terapêutica, em torno de 25 – 30% são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, microorganismos e animais) ou são derivações destes produtos.

As plantas ao longo dos anos têm sido fontes para o desenvolvimento de inúmeros medicamentos utilizados em diversas doenças tais como úlceras, asma, ansiedade, depressão, entre outras. É relevante ressaltar que para a investigação de novas drogas, sejam elas de origem vegetal ou não, são utilizados modelos animais já padronizados por diversas evidências científicas.

Em relação à investigação de compostos com atividade analgésica, como é o caso do presente trabalho, vários modelos de nocicepção, em animais de laboratório, são atualmente disponíveis. Entretanto, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como reprodutibilidade, simplicidade e possibilidade de serem correlacionadas com estudos clínicos (DICKENSON; BESSON, 1997).

No caso das doenças inflamatórias, vários modelos animais são disponíveis na literatura científica. Vale destacar que, embora a maioria destas doenças inflamatórias severas e debilitantes seja de natureza crônica, modelos inflamatórios agudos são importantes para a descoberta, triagem e “*screening*”, de novas drogas, exatamente por serem mais simples e também reproduzíveis. Além disso, os modelos de inflamação aguda também são adequados para a investigação da transição do processo agudo para crônico (SEDGWICK; LEES, 1986).

O ponto de partida deste estudo foi avaliar a propriedade antinociceptiva da riparina II. Para isto foi utilizado o teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético, descrito previamente por Koster *et al.* (1959). A literatura científica mostra que administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de vários mediadores presentes no processo inflamatório, como as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, bradicinina (BK) entre outros, sendo considerado, portanto, um típico modelo de nocicepção inflamatória visceral (RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001).

A nociceção causada pelo ácido acético, além de ser influenciada por muitas substâncias pró-inflamatórias liberadas, pode ser mediada em parte pela dissociação de prótons presentes no ácido acético, os quais estimulam diretamente canais de cátions não seletivos, como canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) e TRPV1, localizados em neurônios aferentes primários, promovendo assim o início da dor visceral (IKEDA *et al.*, 2001; JULIUS *et al.*, 2001; COUTAUX *et al.*, 2005).

O comportamento de contorção em camundongos tanto é utilizado para avaliar um potencial analgésico central, como periférico de drogas, uma vez que o ácido acético induz algesia pela liberação de substâncias dos mastócitos e macrófagos peritoneais, além da sensibilização das terminações sensoriais aferentes periféricas (RIBEIRO *et al.*, 2000). O efeito antinociceptivo é interpretado por uma diminuição do número de contorções.

No presente trabalho ocorreu uma redução do número de contorções abdominais em camundongos tratados com riparina II, semelhante ao que ocorreu nos animais tratados com a droga de referência, neste caso, a indometacina, reconhecido antiinflamatório não esteroideal. Este teste é classicamente utilizado como teste de partida para o estudo de possíveis drogas analgésicas, entretanto ele é considerado inespecífico por várias razões. Uma delas é que alguns estudos já demonstraram que drogas não analgésicas, como atropina, antidepressivos tricíclicos, antihistamínicos, antihipertensivos entre outros agentes possuem também efeito inibitório sobre as contorções (COLLIER *et al.*, 1968; STEPANOVIC PETROVIC *et al.*, 2008).

Assim, a redução das contorções observada no presente trabalho pode ter ocorrido por diversos mecanismos, tanto a nível central como periférico, visto que este teste não discrimina entre uma ação e outra, ou pode ter ocorrido mesmo por meios não relacionados à nociceção, ou devido a mecanismos inflamatórios, tais como o comprometimento das habilidades motoras (LE BARS *et al.*, 2001).

Com base nestas considerações, partimos, então para a utilização de um outro modelo experimental de estudo de drogas antinociceptivas que confirmasse ou não esta atividade antinociceptiva e que desse indícios se havia envolvimento central nos efeitos da riparina II. Para isto, utilizamos o teste da placa quente de acordo com método descrito previamente por Huskaar *et al.*, (1986).

O teste da placa quente (HUSKAAR *et al.*, 1986) mostra uma resposta do animal frente a um estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central. O comportamento do roedor de saltar ou lambe as patas é indicativo de resposta ao estímulo nociceptivo térmico e a redução destes parâmetros é interpretado como efeito antinociceptivo. Este teste é sensível às substâncias que agem no sistema nervoso central, como antidepressivos e sedativos (ALMEIDA *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2009).

O tratamento oral com a riparina II, não foi capaz de aumentar o tempo de reação no teste da placa quente, diferente da injeção intraperitoneal de morfina que promoveu um aumento do tempo de reação de camundongos em resposta ao calor. Sendo assim, com base nos resultados neste teste, descartamos o possível envolvimento central nos efeitos antinociceptivos da riparina II.

Dando continuidade à investigação dos efeitos antinociceptivos utilizamos o teste da nocicepção induzida pela formalina, um modelo clássico para o estudo de drogas desta categoria. O teste da formalina é um modelo de dor persistente que consiste na injeção intraplantar de uma solução de formol a 1%. O animal responde ao estímulo químico com o comportamento de lambe a pata e a redução deste comportamento é interpretada como um efeito antinociceptivo.

A resposta nociceptiva induzida pela formalina apresenta caracteristicamente duas fases que envolvem diferentes mecanismos (TJOLSEN; HOLE, 1997; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001). A primeira fase é observada durante os cinco minutos após a aplicação do estímulo, caracterizando uma dor de origem neurogênica. A nocicepção nessa fase (0-5 min) é resultado da estimulação química direta de nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente as fibras C, e pode ser suprimida por medicamentos opióides como a morfina (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). A segunda fase começa cerca de 15 minutos após a injeção da formalina, caracterizando uma dor de origem inflamatória, que é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinal e central (TJOLSEN *et al.*, 1992; TJOLSEN; HOLE, 1997).

Estudos têm demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores provoca a liberação de várias substâncias algicas e pró inflamatórias, as quais podem estar diretamente relacionadas às fases características deste modelo. Dentre as substâncias liberadas, podemos

destacar o glutamato, prostaglandinas, óxido nítrico, taquicininas, prótons e bradicinina, dentre outros (TJOLSEN *et al.*, 1992; MALMBERG *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1997a).

Investigações anteriores relataram que a substância P e a bradicinina participam da primeira fase do teste e que drogas tais como codeína, morfina e orfenadrina (medicamentos de ação central), reduzem o tempo de lambedura da pata em resposta à formalina, tanto na primeira como na segunda fase. Por outro lado, vários mediadores estão envolvidos na segunda fase (histamina, serotonina, aminoácidos excitatórios, prostaglandinas e bradicinina) e, drogas como a indometacina e o naproxeno (exemplos de AINEs), diminuem a nocicepção apenas na segunda fase do teste (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TJOLSEN *et al.*, 1992; DAI *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a riparina II inibiu o tempo de lambedura da pata dos animais, somente na segunda fase do teste, confirmando os resultados da placa quente, de uma ausência de ação central e dando indicações de um efeito antinociceptivo relacionado à inibição de mediadores inflamatórios, visto que seu efeito foi observado apenas na segunda fase do teste.

Estudos procurando esclarecer os mecanismos nociceptivos envolvidos no teste da formalina mostram que a enzima PKC possui um importante papel na estimulação nociceptiva na segunda fase deste teste, evidenciado pelo fato de que inibidores não seletivos desta enzima atenuaram apenas a fase inflamatória do modelo (YASHPAL *et al.*, 1995). De fato, estudos utilizando camundongos desprovidos de PKC mostram que estes animais exibem diminuição no comportamento nociceptivo induzido pela formalina (CHEN *et al.*, 1997).

Outros relatos indicam que o efeito nociceptivo de ambas as fases do teste da formalina pode estar intimamente relacionado à ativação dos receptores do tipo TRPV1 (HWANG *et al.*, 2000) e que substâncias que modulam este receptor, reduzem a nocicepção induzida pela formalina (SANTOS *et al.*, 1997b) sugerindo a participação deste receptor neste modelo de nocicepção. Alguns estudos prévios também têm demonstrado o envolvimento do receptor TRPV1 nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (IKEDA *et al.*, 2001).

Os receptores TRPV1 são canais de cátions não seletivos, sensíveis a ligantes, presentes não somente nos terminais periféricos, mas também em outros tecidos envolvidos na nocicepção e na inflamação. Estes receptores são ativados pela capsaicina (e por outros vanilóides semelhantes à resiferatoxina), bem como por estímulos fisiológicos e ligantes endógenos (GAVVA *et al.*, 2004). Vários estudos têm demonstrado que a utilização de antagonistas desse receptor provoca antinocicepção em vários modelos experimentais, tanto em camundongos, quanto em ratos (SANTOS *et al.*, 1997b; JHAVERI *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2007; JOSHI *et al.*, 2008).

Estudos anteriores demonstraram que a injeção intraplantar de capsaicina na pata direita traseira de animais causava uma forte nocicepção com reações dolorosas e subsequente dessensibilização (MELO *et al.*, 2006). A resposta do roedor ao estímulo químico da capsaicina é caracterizado por mordidas e lambidas (SAKURADA *et al.*, 1992). Vale salientar que a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida) é um ingrediente pungente extraído da pimenta vermelha, *Capsicum annuum L.*, que promove nocicepção principalmente pela ativação do receptor TRPV-1 (SZALLASI *et al.*, 1993; CATERINA *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 1998)

Estudos mostram que a capsaicina leva a um aumento na ativação de nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias do tipo C e A $\delta$ , sendo capaz de despolarizar os neurônios sensoriais e corpos celulares, produzindo um aumento da condutância e da permeabilidade para o Ca<sup>2+</sup> (MARSH *et al.*, 1987). O influxo de Ca<sup>2+</sup> causado pela capsaicina também causa a liberação de outros neurotransmissores e neuromoduladores das terminações periféricas das fibras sensoriais (GAMSE, 1982; HOLZER, 1988).

O vermelho de rutênio é um antagonista não competitivo do receptor TRPV-1 que atua bloqueando o influxo de Ca<sup>2+</sup>, inibindo a atividade excitatória mediada pela capsaicina, além de inibir a liberação dos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> por bloquear receptores de rianodina (SZALALASI; BLUMBERG, 1999).

Assim, baseado nas evidências do papel do receptor TRPV1 no modelo da formalina, nosso estudo procurou investigar se a antinocicepção produzida pela riparina II poderia estar relacionada com a modulação destes receptores. Os resultados obtidos do nosso estudo mostraram que a riparina II administrada por via oral (doses de 25 e 50 mg/kg) e o vermelho



de rutênio (3 mg/kg), droga de referência, foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela administração de capsaicina em camundongos, indicando o envolvimento deste receptor no efeito antinociceptivo da riparina II.

Estudos recentes mostraram que a capsaicina quando está ligada ao receptor TRPV-1, promove a liberação de alguns neurotransmissores e peptídeos neuroativos, como o glutamato e a substância P em terminais periféricos, e que essa liberação está relacionada à atividade da PKC (MEDVEDEVA *et al.*, 2008). De fato, estudos prévios demonstraram que esta enzima tem um papel importante na liberação desses neurotransmissores na medula espinhal, tendo em vista que inibidores da mesma reduzem a liberação de glutamato e CGRP provocados pela estimulação com a capsaicina (SWEITZER *et al.*, 2004).

Dados anteriores já descreveram que o glutamato (Glu) é um dos neurotransmissores mais envolvidos na sensação nociceptiva e antinociceptiva (RIEDEL *et al.*, 2001) e que os receptores glutamatérgicos estão presentes tanto em fibras nociceptivas periféricas, quanto centrais e modulam a ação de várias substâncias envolvidas no processo doloroso (FUNDYTUS *et al.*, 2001). Estudos prévios relataram que a administração intraplantar de glutamato causa ativação direta dos nociceptores, liberação de mediadores inflamatórios, neuropeptídeos, e do próprio glutamato, em terminais periféricos e centrais (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2003).

Beirith, Santos e Calixto (2002), já haviam demonstrado que a injeção de glutamato na região intraplantar de camundongos causava um comportamento nociceptivo acompanhado de formação de edema de forma dose-dependente. Em seus experimentos eles relataram que a resposta máxima do edema foi obtida nos primeiros 15 minutos, decresceu entre 15 e 30 minutos, foi quase ausente após 30 minutos e houve um aumento significativo do volume da pata 40 minutos após a injeção. Além disso, estudos anteriores de Carlton, Hargett e Coggeshall (1995) revelavam que os receptores AMPA e NMDA estavam presentes na pata traseira de ratos, fornecendo, deste modo, uma base anatômica que justificaria a ação periférica do glutamato exógeno.

Com base nestas considerações, decidimos investigar se a ação antinociceptiva da riparina II estaria relacionada à liberação de algum desses mediadores. Desta forma no presente trabalho foi avaliado o efeito da riparina II na nocicepção induzida por glutamato em

camundongos. Os resultados mostraram uma resposta antinociceptiva significativa da riparina II, nas duas doses utilizadas, indicando sua ação inibitória sobre o glutamato.

Baseados em todos os modelos executados podemos sugerir um efeito antinociceptivo da riparina II. Entretanto, evidências na literatura (SANTOS *et al.*, 2001; FRANÇA *et al.*, 2001) sugerem que efeitos sedativos sobre o sistema nervoso central assim como efeito relaxante muscular não específico podem reduzir a resposta de coordenação motora, interferindo, desta maneira, na interpretação dos efeitos antinociceptivos. Para eliminar a possibilidade de resultados falso-positivos, geralmente são executados o teste do campo ou do Rota Rod, que avaliam a atividade motora dos animais. Com base nestas considerações, Sousa *et al.*, (2007), em trabalhos anteriores, já demonstraram que nenhuma alteração significativa ocorreu nos animais tratados, por via oral, com riparina II nas doses de 25 e 50 mg/kg, quando submetidos aos testes do campo aberto e rota rod. Estes resultados confirmam que a antinocicepção exercida pela riparina II não está relacionada com alterações na coordenação motora dos animais.

Assim os efeitos antinociceptivos da riparina II foram bem evidenciados, mas vale destacar que os resultados obtidos neste trabalho mostraram que no teste da formalina a riparina II inibiu o tempo de lambertura da pata dos animais, somente na segunda fase do teste, uma fase considerada inflamatória dada vista à liberação de mediadores inflamatórios nesta fase. Desta forma, decidimos partir para a investigação dos efeitos antiinflamatórios da riparina II e seu papel na liberação de outros mediadores inflamatórios.

A literatura relata que mediadores inflamatórios como prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, são liberadas na cavidade peritoneal por células endoteliais e células residentes localizadas no peritônio (RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). De fato, a ativação dessas células e a liberação de vários mediadores inflamatórios ocorrem nos animais nos modelos empregados no presente trabalho.

Um modelo clássico que vem sendo utilizado há muito tempo para avaliar a atividade antiinflamatória de novos compostos é o edema de pata induzido por carragenina. Este teste é caracterizado pela indução uma resposta inflamatória persistente após a administração de carragenina na pata de animais (NANTEL *et al.*, 1999; PASSOS *et al.*, 2007; MARIOTTO *et al.*, 2008). A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa de variedades

naturais de algas das famílias *Gigartinaceae*, *Solieriaceae*, *Hypneaecae* e *Furcellariaceae* da classe Rhodophyceae (algas vermelhas).

Através do uso deste modelo da carragenina foi que os pesquisadores da Merck, Sharp & Dohme demonstraram a atividade antiinflamatória da indometacina. Portanto, esse modelo foi, e continua sendo importante para o desenvolvimento de novas drogas com potencial antiinflamatório (MORRIS, 2003; WILLOUGHBY, 2003)

O edema de pata induzido por carragenina possui um perfil multifásico, onde a fase inicial do modelo é mediada principalmente por histamina, serotonina e bradicinina, seguida do aumento da síntese de prostaglandinas no tecido inflamado. Este aumento coincide com a migração de leucócitos, os quais são capazes de amplificar a resposta inflamatória, com a produção de outros mediadores inflamatórios, de espécies reativas do oxigênio, aumento da atividade da mieloperoxidase e aumento da produção de NO (FANTONE; WARD, 1982; ANTONIO; SOUSA BRITO, 1998; NANTEL *et al.*, 1999; POSADAS *et al.*, 2004).

O processo inflamatório induzido pela carragenina é um processo agudo, não imune, altamente reproduzível e bem estudado. A carragenina quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal, é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação – edema (tumor), eritema (rubor) e hiperalgesia (maior sensibilidade à estímulos dolorosos), os quais se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória (MORRIS, 2003).

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, o pré-tratamento com indometacina, um antiinflamatório não esteroide, aboliu quase totalmente o edema, confirmando a validade do teste. De fato, a literatura mostra que a indometacina, como outros AINEs, produzem efeitos anti- edematogênicos no modelo de edema de pata induzido pela carragenina (HENRIQUES *et al.*, 1987).

A riparina II, semelhante à indometacina mostrou-se capaz de reduzir a formação do edema. Este efeito foi observado da segunda a vigésima quarta hora, sugerindo que o modo de ação da riparina II pode envolver alguns dos mediadores implicados no edema de pata induzido por carragenina, como por exemplo, histamina, serotonina e bradicinina e prostaglandinas.

Partindo deste princípio que a ação antiinflamatória da riparina II poderia envolver, por exemplo, os mediadores histamina e serotonina, partimos para a investigação dos efeitos da mesma no edema de pata induzido por dextrano, um polissacarídeo, classicamente reconhecido pela capacidade desse de liberar os mediadores inflamatórios histamina e serotonina dos mastócitos (LO *et al.*, 1982; GUPTA *et al.*, 2003).

O edema de pata induzido por dextrano apresenta um mecanismo distinto ao edema de pata induzido por carragenina. O dextrano, igualmente à carragenina, promove aumento da permeabilidade vascular, porém este fenômeno ocorre devido à degranulação dos mastócitos, com a subsequente liberação de histamina e serotonina. Outra diferença é que o exsudato, que ocorre como consequência desse processo, é bem mais carente de proteínas e neutrófilos (LO *et al.*, 1982). O dextrano promove um rápido extravasamento de fluido, com poucas proteínas e leucócitos.

As drogas antiedematogênicas que inibem significativamente a resposta da pata de um animal ao dextrano podem estar agindo por vários mecanismos: podem apresentar um efeito direto sobre a inibição da permeabilidade tissular ou da dinâmica de fluidos; podem antagonizar especificamente os agentes responsáveis diretamente pelo edema; e podem interromper os processos nervosos ou humorais que levam a formação dos agentes edematogênicos (COURVOISIER; DUCROT, 1955).

No presente trabalho a riparina II promoveu uma diminuição da formação de edema induzido pela injeção intraplantar de dextrano, sugerindo sua capacidade de bloquear as ações da histamina e serotonina. Estes resultados indicam que a riparina II deve apresentar ação vasoativa direta, propriedade antagonista específica ou alguma ação que interrompa os processos neurohumorais.

Neste contexto de esclarecer a influência da riparina II sobre os mediadores histamina e serotonina na mediação de seus efeitos antiinflamatórios decidimos avaliar os efeitos desta substância nos edemas de pata induzidos pela injeção intraplantar da histamina e da serotonina.

Sabe-se que a histamina é uma amina vasoativa que desempenha papel fundamental no processo inflamatório através do aumento da permeabilidade celular, que inicia uma

vasodilatação, desencadeada pela ligação da mesma aos receptores H1 das células endoteliais. A histamina é fundamental para a contração e separação das células endoteliais permitindo assim a passagem dos leucócitos circulantes. O principal local de armazenamento da histamina na maioria dos tecidos é no mastócito e no sangue, no basófilo. É relevante também destacar que a histamina tem um efeito ativador sobre a fosfolipase A2, enzima responsável pela formação de prostaglandinas (MENEZES DE LIMA JR *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostraram que a riparina II é capaz de diminuir o edema induzido pela histamina, mas não pela serotonina. Estes resultados apontam para uma possível substância antiinflamatória com efeitos antihistamínicos. A partir daí, decidimos investigar o efeito da riparina II sobre a bradicinina, um outro reconhecido mediador inflamatório.

A bradicinina, proveniente do sistema das cininas, é conhecida como um potente peptídeo vasoativo que promove o aumento da permeabilidade vascular, dilatação das vênulas, maior secreção de fluidos e produção de dor e hiperalgesia (LEWIS, 1970; GARCIA LEME, 1978; MARCEAU *et al.*, 1983; STERANKA; BURCH, 1991; DRAY; PERKINS, 1993; CAMPOS; CALIXTO, 1995). A bradicinina também regula algumas ações inerentes ao processo inflamatório como a dor, excitando neurônios que promovem a liberação de neuropeptídeos como a substância P, e na fase aguda ela é responsável pela potencialização da aderência e ativação dos neutrófilos. Ela estimula também, a liberação do ácido araquidônico, por meio da ativação da fosfolipase A2, desencadeando a produção de mediadores como IL-1 e TNF nas células inflamatórias (MORROW *et al.*, 2005). Alguns estudos demonstraram que a administração de bradicinina causa reação inflamatória duradoura e este efeito é primariamente mediado por ativação de receptores B2. (MORAIS *et al.*, 1999).

Sabe-se que o papel inflamatório da bradicinina ocorre, pelo menos em parte, pela ativação da PKC e posteriormente sensibilização do receptor TRPV1, que conseqüentemente facilita a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios pela entrada de cálcio nas células (MIZUMURA *et al.*, 2005). Neste trabalho, a riparina II reduziu a formação de edema induzido pela bradicinina. Assim não podemos descartar a hipótese de que a riparina II ao inibir a liberação da bradicinina, impede a ligação da mesma aos receptores B, impedindo conseqüentemente seu efeito sobre a mobilização do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas e leucotrienos, dois importantes mediadores inflamatórios lipídicos.

Assim, a capacidade da riparina II em diminuir a formação de edema induzido por carragenina, dextrano, histamina e bradicinina sugerem uma capacidade desta substância de interferir no estabelecimento inicial do processo inflamatório, visto que esses mediadores são mais importantes nesta fase do processo inflamatório agudo.

Devido à importância do papel dos leucócitos nos processos inflamatórios agudos e crônicos, muita atenção tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimativa da migração desses leucócitos. Os modelos animais envolvendo cavidades como a cavidade pleural, peritoneal, e também o modelo de inflamação na bolsa de ar permitem que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK; LEES, 1986).

Vale ressaltar que a inflamação aguda é caracterizada por dilatação dos vasos, exsudação de plasma e migração celular para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004), desta forma, seguindo o aumento na permeabilidade vascular, há o infiltrado celular, principalmente de neutrófilos, que contribuem para o processo inflamatório através da produção, dentre outros mediadores, de radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido e radicais hidroxilas (POSADAS *et al.*, 2004).

A literatura descreve que a carragenina é um agente flogístico indireto que no peritônio de ratos induz a migração de neutrófilos dependentes da ativação de macrófagos residentes (SOUZA *et al.*, 1988) e o fMLP é um peptídeo com reconhecida ação quimiotática direta sobre os neutrófilos (RIBEIRO *et al.*, 1996). Além disso, estudos mostram que a injeção de carragenina no peritônio de ratos induz a expressão da NO sintase e COX-2, levando assim a liberação de grande quantidade de NO e PGs (TOMLINSON *et al.*, 1994; HATANAKA *et al.*, 1999).

Durante o processo da peritonite ocorre um aumento no transporte de solutos entre o plasma e a membrana porosa, além da produção de migração celular. Essas alterações devem-se à vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e pela abertura dos poros nos microvasos, causados por mediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e prostaglandina E2, respectivamente (PAULINO *et al.*, 2008).

O fMLP, produto do metabolismo bacteriano, é um potente peptídeo quimiotático da resposta imune (MURPHY, 1994). A ligação do fMLP ao seu receptor, causa ativação da fosfolipase C e a produção de segundos mensageiros que desencadeiam a liberação de cálcio intracelular e exocitose de enzimas (NICK *et al.*, 1997). Portanto, o fMLP é um ativador de neutrófilos e macrófagos, e o resultado dessa ativação é a secreção de enzimas lisossomais, incluindo a mieloperoxidase (SPISANI *et al.*, 1996; SEGAL 2005).

Com base em todas estas considerações, resolvemos também investigar o papel da riparina II sobre a migração celular através da execução do modelo de peritonite induzida por carragenina ou fMLP no peritônio de ratos. Nossos resultados mostraram que a administração de carragenina ou fMLP levou a formação de um infiltrado celular expressivo, e que o pré tratamento com riparina II, semelhante à dexametasona, usada como droga de referência, causou uma diminuição do número de leucócitos induzidos por ambos agentes na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo controle. Vale salientar que os polimorfonucleares são as principais células a migrarem para a cavidade peritoneal, nesta fase inicial da resposta inflamatória, neste modelo experimental (SALEH; MEDEIROS, 1999).

A inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal pode se dar por dois mecanismos: a inibição da produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão, haja vista que os leucócitos necessitam de substâncias quimiotáticas que facilitem sua migração para o local onde esta ocorrendo à injúria, inflamação, para então desencadear seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

De uma forma geral, antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona reduzem muitos sinais característicos do processo inflamatório (GOULDING, 2004; CARAMORI *et al.*, 2005). De fato, alguns estudos mostram que os AINES reduzem a ativação de fatores de transcrição como a Proteína Ativadora – 1 (AP-1) e o fator nuclear NF- $\kappa$ B, fatores relacionados com a ativação de genes de citocinas primárias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , substâncias potentes em muitas ações envolvidas na migração leucocitária. A redução do influxo leucocitário também está associada à inibição da mieloperoxidase (PEREIRA *et al.*, 2006), enzima importante nos processos inflamatórios.

Alguns estudos referem que a persistência da resposta inflamatória provocada pela carragenina após o período de 3 a 4 h possivelmente, seja devido à migração de leucócitos para o tecido, liberação de enzimas proteolíticas por estas células e geração de prostaglandinas no local. Tais fatores mantêm a permeabilidade vascular aumentada, e podem causar dano ao tecido conjuntivo, com a liberação ou formação de mediadores adicionais (CRUNKHORN; MEACOCK, 1971).

Um parâmetro comumente usado para se ter uma medida, mesmo que indireta, do conteúdo tecidual de neutrófilos é a medida da presença de MPO ativa. A MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, liberada após a ativação dos leucócitos, dentro do fagossomo ou no espaço extracelular. Uma vez liberada, a MPO reage com o peróxido de hidrogênio formado pela NADPH oxidase, e aumenta o potencial tóxico deste oxidante. O sistema hidroperóxido-MPO, também promove a oxidação do cloreto, tirosina e nitrito, induzindo a formação de ácido hipocloroso, outros derivados do cloro, radicais tirosina, e intermediários reativos de nitrogênio, enfim, compostos que podem atacar a superfície das membranas dos microorganismos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Considerando assim que a inibição da MPO é mais um indicador de atividade antiinflamatória (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; PASSOS *et al.*, 2007), resolvemos no presente projeto determinar a atividade da MPO no fluido peritoneal. A injeção intraperitoneal de carragenina no fluido peritoneal causou um aumento da atividade desta enzima e o pré-tratamento com riparina II, assim como ocorreu com a dexametasona, droga de referência utilizada, reduziu a atividade da MPO, sugerindo um papel inibidor da riparina II neste processo.

A determinação do conteúdo de proteínas no fluido peritoneal mostrou que a riparina, nas duas doses utilizadas, reduziu de forma significativa a concentração de proteínas, semelhante à dexametasona, quando comparado com o controle, confirmando a sua ação inibitória sobre a produção de conteúdo inflamatório.

Neste trabalho também decidimos investigar se o efeito antiinflamatório da riparina II estaria relacionado, de alguma forma, à inibição da liberação de algumas citocinas, especialmente, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . As citocinas são substâncias importantes em muitos processos



fisiológicos e patológicos. Elas são plurifuncionais, modulam muitos processos biológicos essenciais; são secretadas por uma grande variedade de tipos celulares, sendo capazes de regular a hematopoiese, inflamação e principalmente o crescimento e diferenciação celular. Geralmente, as citocinas atuam de forma parácrina (próximo às células que a produzem) ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem) (MONTENEGRO; FRANCO, 1999).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina que estimula a infiltração de neutrófilos, e que pode agir como mediador final ou através da indução e secreção de eicosanóides e quimiocinas (ZHANG *et al.*, 2001). TNF- $\alpha$  é uma outra citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por macrófagos ativados, que tem um papel fundamental em diversas condições tais como inflamação, imuno-modulação, citotoxicidade e apoptose (AGGARWAL; NATARAJAN, 1996). Esta citocina é reconhecida como quimioatraente e está intimamente associada com processo de migração de neutrófilos (CROSARA *et al.*, 1996). TNF- $\alpha$  é um dos agentes liberados pela carragenina, em sua fase inicial e uma marcador de inflamação aguda.

Nossos resultados da dosagem da concentração TNF-  $\alpha$  e IL-1b no fluido peritoneal de ratos com peritonite induzida por carragenina mostraram que a riparina II possui a capacidade de reduzir a concentração de TNF-  $\alpha$  e IL-1b corroborando com os resultados da medida dos edemas e a contagem de leucócitos, confirmando uma possível atividade antiinflamatória da riparina II.

Assim, de uma forma geral, os resultados conjuntamente revelam um importante efeito nociceptivo e antiinflamatório da riparina II.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A riparina II foi testada em modelos animais de nocicepção e inflamação. Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- A riparina II possui atividade antinociceptiva, evidenciada nos modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina (segunda fase), capsaicina e glutamato
- A atividade antinociceptiva parece não estar relacionada com mecanismos centrais, pois não houve qualquer efeito sobre o teste da placa quente
- A riparina II possui ação antiinflamatória caracterizada pela sua ação na segunda fase do teste da formalina juntamente com a capacidade em reduzir edemas de pata induzidos por carragenina, dextrano, histamina e bradicinina
- A ação antiinflamatória da riparina II parece não estar diretamente relacionada com a serotonina
- A riparina II foi capaz de reduzir a migração de leucócitos para a cidade peritoneal tanto por estímulo direto (fMLP) quanto por um indireto (carragenina) e as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a riparina II possui uma atividade antinociceptiva não relacionada a mecanismos centrais e que a sua ação parece interagir com receptores NMDA e TRPV-1.

Foi mostrado que o tratamento com a riparina II possui ação antiinflamatória em vários modelos experimentais, o que é evidenciado pela diminuição do edema de pata induzido pela carragenina, dextrano, assim como por alguns mediadores conhecidos por participar da resposta inflamatória, como a histamina e bradicinina. Além da redução da migração de leucócitos e de citocinas pró inflamatórias.

A riparina II, substância isolada do fruto não maduro de *Aniba riparia*, pode funcionar como uma forte ferramenta a ser explorada e uma possível utilização na produção de drogas utilizadas no tratamento da dor e da inflamação, tendo em vista o aumento do interesse em buscar moléculas na natureza com potencial terapêutico. Para tanto devem ser realizados experimentos adicionais para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e antiinflamatória.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: Developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 7, p. 93–124, 1996.
- ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M., MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Anibariparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **NaunSchm. Arch. Pharmacol.**, v. 380, p. 337-344, 2009.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Med. Sci. Monit.**, v. 12, p. 225 – 234, 2006.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. (Ed.). **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: editora, 2006. p. 179-188.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research.**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol. Therap.**, v. 112, p. 171–183, 2006.
- ANDREEVA, L.; RANG, H. P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, p. 185-190, 1993
- ANTÔNIO, M. A.; SOUZA BRITO, A. R. Oral antiinflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 61, p. 215-228, 1998
- ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of látex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm.**, v. 4, p. 228 – 232, 2005.
- AUSTIN, C. E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H. E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D. J.; BATHON, J. M.; PROUD, D. Stable expression of the human kinin B1 receptor in chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 11420–11425, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of severall new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Quím. Nova**, v. 13, p. 332 - 334, 1990.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615 - 2617, 1987.

BARBOSA, R. C. S. B.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 91 - 94, 1988.

BEERS, M. H. **The Merck manual of medicinal information**. 2<sup>nd</sup> ed. on line version. 2003. Disponível em: <<http://www.merck.com/mmhe/index.html>.> Acesso em: 10 June 2010.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, v. 924, p. 219–228, 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, v. 969, p. 110-116, 2003.

BEICHE, F.; SCHEUERER, S.; BRUNE, K.; GEISLINGER, G.; GOPPELTSTRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **FEBS Lett.**, v. 390, p. 165-169, 1996.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618, 1982.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with a enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206 – 209, 1982.

BROCHU, S.; OLIVIER, M.; RIVEST, S. Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines, I $\kappa$ B $\alpha$ , and iNOS in the mouse brain during acute endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei brucei*. **J. Neurosci. Res.**, v.57, p.801-16. 1999.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacol. Therap.**, v. 107, p. 139 – 154, 2005.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Planta Med.**, v. 69, p. 973 – 983, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

- CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1005-1013, 1995.
- CARAMORI, G.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, p. 455-463, 2005.
- CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci. Lett.**, v. 197, p. 25-28, 1995.
- CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, v. 790, p. 160-169, 1998.
- CARRAWAY, M. S.; WELTY-WOLF, K. E.; MILLER, D. L. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 67, p. 1200-1209, 2003.
- CASTELO-BRANCO, V. U. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxi-benzoil)-tiramina.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.
- CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farm. Bonaer.**, v. 19, p. 197 - 202, 2000.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.
- CHEN, H. S.; LIPTON, S. A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. **J. Neurochem.**, v. 97, p. 1611-1626, 2006.
- COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310. 1968.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371. 2005.
- COUTURE, R.; HARRISON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, p. 161-176, 2001
- CRAIG, A. D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.26, p.1-30, 2003.
- CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 42, p. 392 - 402, 1971.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765-767, 1991.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacol. Res.**, v. 52, p. 72–82, 2005.

DAÍ, Y.; YE, W. C.; WANG, Z. T.; MATSUDA, H.; KUBO, M.; BUT, P. P. H. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 245-250, 2002.

DICKENSON, A.; BESSON, J.M. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer, 1997.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: editora UNESP, 1996.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências da saúde**. 6. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2006

DOURSOUT, M.; LIANG, Y.; CHELLY, J. E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Can. J. Anesth.**, v. 50, p. 909-916, 2003.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p.125-131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, p. 704–712, 1997.

DRAY, A.; PERKINS, M. N. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 99-104, 1993.

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **J. Dental Res.**, v. 82, n. 2, p. 82 – 90, 2003.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. J. Synthetic analgesics. Iidithienyl – butenyl and dithienylbutylamines . **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

FANTONE, J. C.; WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Phatol.**, v. 107, p. 395-418, 1982.

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

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v.32, p.283-288, 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The COXIBS, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 433-442, 2001.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 42, p. 157-164, 2001.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMISTU, T.; TAKESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. **Brain Res.**, v. 657, p. 133-140, 1994.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, p. 29-58, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GAMSE R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 32, p. 205-216, 1982.

GARCIA, L. J. Bradykinin system. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1978. p. 464-522.

GAVVA, N. R.; KLIONSKY, L.; QU, Y.; SHI, L.; TAMIR, R.; EDENSON, S.; ZHANG, T. J.; VISWANADHAN, V. N.; TOTH, A.; PEARCE, L. V.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; BLUMBERG, P. M.; LILE, J.; SUN, Y.; WILD, K.; LOUIS, J. C.; TREANOR, J. J. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 20283-20295, 2004.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Exp. Neurol.**, v. 192, p. 163-166, 2005

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory Resolution: New Opportunities for Drug Discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 401 - 416, 2004

GRELLNER, W. Time-dependent immunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF) in human skin wounds. **Forensic Sci. Int.**, v. 130, p. 90-96, 2002.

GOLAN, D.; TASHJIAN, E.; ARMSTRONG, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; APRIL W. **Princípios de Farmacologia a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOULDING, N. J. The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation – a four-ring circus. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, p. 629-636, 2004.

GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. **Gut**, v. 51, p. i2-5, 2002.

GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L.; KARKI, S. S.; SAMBATHKUMAR, R.; MANIKANDAN, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of Bryonia acinosa in experimental animal models. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p. 1342-1344, 2003.



GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, p. 469 – 487, 2003.

HATANAKA, K.; KAWAMURA, M.; OGINO, K.; MATSUO, S.; HARADA, Y. Expression and function of cyclooxygenase-2 in mesothelial cells during late phase of rat carrageenan-induced pleurisy. **Life Sci.**, v. 65, p. 161-166, 1999.

HAYASHI, I.; AMANO, H.; ISHIHARA, K.; KUMAGAI, Y.; YOSHIMURA, H.; MAJIMA, M. C. The role of kinin B1 in the plasma extravasation of carrageenin-induced pleurisy. **Life Sci.**, v. 70, p. 937-949, 2002.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FILHO, J. A.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 243-249, 1987.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 243 – 249, 1987.

HOLZER P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**. v. 24, p. 739-768, 1988.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res. Immunol.**, v. 147, p. 417-434, 1996.

HUNSKAAR, S.; BERG, O. G.; HOLE, K. A. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behav. Brain Res.**, v. 21, p. 101-108, 1996.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.

HSU, S. M.; RAINE L; FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Hist. Cytochem.**, v. 29, p. 577-580, 1981.

HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 6155-6160, 2000.

IADAROLA, M. J.; CLAUDE, R. M. Good pain, bad pain. **Science**, v. 278, p. 239-240, 1997.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v. 69, p. 2911-2919. 2001.

JESSEL, T. M.; KELLY, D. D. Pain and analgesia. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. New York: Elsevier, 1991. p. 385-399.

JHAVERI, M. D.; ELMES, S. J.; KENDALL, D. A.; CHAPMAN, V. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naive, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 22, p. 361-70, 2005.

JOSHI, S. K.; HONORE, P.; HERNANDEZ, G.; SCHMIDT, R.; GOMTSYAN, A.; SCANIO, M.; KORT, M.; JARVIS, M. F. Additive Antinociceptive Effects of the Selective Nav1.8 Blocker A- 803467 and Selective TRPV1 Antagonists in Rat Inflammatory and Neuropathic Pain Models. **J. Pain.**, v. 10, p. 306-315, 2008.

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

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 39, p. 1786-800, 2009.

KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SHIBAYAMA, Y.; NAKAZAWA, Y.; GHEBREHIWET, B.; REDDIGARI, S.; SIVERBERG, M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. **Clin. Rev. Allergy. Immunol.**, v. 16, p. 403-429, 1998.

KITAGAWA, S.; OHSAKA, A.; YOU, A.; TAKAKU, F.; SAITO, M. The respiratory burst of granulocytes: modulation by inflammatory mediators and its mechanism. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v. 13, p. 299-305, 1988.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAFLAMME, N.; LACROIX S.; RIVEST, S. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **J. Neurosci.**, v.19, p.10923-30. 1999

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokinereregulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, p. 793 – 805, 2004.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. **Exp. Physiol.**, v.87, p. 239 - 244. 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652. 2001.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin pharmacological and toxicological implications. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEVITAN, I. B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 193-212, 1994

LEWIS, G. P. Kinin in inflammation and tissue injury. In: ERDOS, E. G. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1970. p. 516-530.

LIEW, FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol. Lett.**, v. 85, p.131-134, 2003

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353: 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOFGREN, O.; QI, Y.; LUNDBERG, T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally-induced inflammatory reactions in a rat model. **Burns**, v. 25, p. 125-129, 1999.

LOPES, P.; KAR, S.; CHRE'TIEN, L.; REGOLI, D.; QUIRION, R.; COUTURE, R. Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8]-bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 68, p. 867-881, 1995.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 221, p. 261-267, 1982.

LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MA, W.; QUIRION, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. **Expert. Opin. Ther. Targets**, v. 11, p. 307-320, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MALMBERG, A. B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A. I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . **Science**, v. 278, p. 279-83, 1997.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 2768-2776, 1995.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 521-532, 2005.

MARIOTTO, S.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; CIAMPA, A.; MAZZON, E.; DE PRATI, A. C.; DARRA, E.; VINCENZI, S.; CUCINOTTA, G.; CAMINITI, R.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 57, p. 110-124, 2008.

MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J. P. Pharmacology of kinins; their relevance to tissue injury and inflammation. **Gen. Pharmacol.**, v. 14, p. 209-229, 1983.

MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. **Am. J. Med.**, v. 101, p. S6-S18, 1996.

MATHIS, S. A.; CRISCIMAGNA, N. L.; LEEB-LUNDBERG, L. M. F. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 50, p. 128-139, 1996.

MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J. P. Pharmacology of kinins; their relevance to tissue injury and inflammation. **Gen. Pharmacol.**, v. 14, p. 209-229, 1983.

MARSH, S. J.; STANSFELD, C. E.; BROWN, D. A.; DAVEY, R.; MCCARTHY, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. **Neuroscience**, v. 23, p. 275-289, 1987.

MEDVEDEVA, Y. V.; KIM, M. S.; USACHEV, Y. M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 5295-5311, 2008.

MELO, C. M.; MAIA, J. L.; CAVALCANTE, I. J.; LIMA, M. A.; VIEIRA, G. A.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. 12-Acetoxyhawthornic acid lactone, a diterpene from *Egletes viscosa*, attenuates capsaicin-induced ear edema and hindpaw nociception in mice: possible mechanisms. **Planta Med.** v. 72, p. 584-589, 2006.

MENEZES, L. J. O.; KASSUYA, C. A. L.; NASCIMENTO, A. F. Z.; HENRIQUES, M. G. M. O.; CALIXTO, J. B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: Implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 80, p. 123-135, 2006.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 161-164, 1999.

MIZUMURA, K.; SUGIUR, T.; KODA, H.; KATANOSAKA, K.; KUMAR, B. R.; GIRON, R.; TOMINAGA, M. Pain and Bradykinin Receptors--sensory transduction mechanism in the nociceptor terminals and expression change of bradykinin receptors in inflamed condition. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v. 25, p. 33-38, 2005.

MONTENEGRO M. R.; FRANCO M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: \_\_\_\_\_. **Patologia: processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 109-128.

MORAIS, F. V.; MOLINA, H. M.; BORGES, D. R.; KOUYOUMDJIAN, M. Bradykinin-inactivating enzyme is released from the ex-vivo stored liver. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 45, p. 19-23, 1999.

MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. Autacóides derivados dos lipídeos – Eicosanóides e fator de ativação das plaquetas. In: GILMAN, A. F. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, 2003. p. 503 – 515.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol. Biol.**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MUIR, W. W. Anaesthesia and pain management in horses. **Equine Vet. Educ.**, v. 10, p. 335-340, 1998.

MURPHY, P. M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 593-633, 1994.

MURPHY, P. G.; RAMER, M. S.; BORTHWICK, L.; GAULDIE, J.; RICHARDSON, P. M.; BISBY, M. A. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p. 2243–2253, 1999.

NANTEL, F.; DENIS D.; GORDON R.; NORTHEY A.; CIRINO M.; METTERS K. M.; CHAN C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, p. 853-859, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846 – 852, 2002.

NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. **J. Biol.Chem.**, v. 273, p. 2784–2791, 1998.

NICK, J. A.; AVDI, N. J.; YOUNG, S. K.; KNALL, C.; GERWINS, P.; JOHNSON, G. L.; WORTHEN, G. S. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. **J. Clin. Invest.**, v. 99; p. 975-986, 1997.

OKUDA, K.; SAKURADA, C.; TAKAHASHI, M.; YAMADA, T.; SAKURADA, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, v. 92, p. 107-115, 2001.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 315 – 424, 2007.

PARRATT, J. R.; WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, egg white and compound. **Br. J. Pharmacol.**, v. 13, p. 65-70, 1958.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA D.; NAGASAWA H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 587, p. 1–3, 2008.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Antiinflammatory effects of *Tacrolimus* in a mouse model of pleurisy. **Transplant. Immunol.**, v. 16, p. 105 – 111, 2006.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA, J. A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S. M.; PESQUERO, J. L.; PAIVA, A. C. M.; CALIXTO, J. B.; LEWIN, G. R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 8140-8145, 2000.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 331-338, 2004.

PORTO, C. C. **Exame clínico:** bases para a prática médica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo. **Rodriguésia**, v. 53, p. 59 -121, 2002.

RACKE, K.; SCHWORER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. **Pharmacol. Res.**, v. 23, p. 13-25, 2000.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmac. Res.**, v. 3, p. 263-269, 1996.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; SOUZA, M. H. L. P.; OLIVEIRA, S. H. P.; COSTA, C. H. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v. 112, p. 27-35, 1996.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.**, v. 60, p. 404-415, 2001.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.**, v. 49, p. 123-133, 1998.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; MATSUMURA T.; MORIYAMA T.; SAKURADA C.; UENO S.; SAKURADA, S.; Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin induced desensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, p. 115-121, 2003.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, p. 949-956, 1999.

SALEH, T. S. F.; VIANNA, R. M. J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CHAKRAVARTY, B.J. M.; KYLE, D. J.; CALIXTO, J. B. Oral-anti-inflammatory action of NPC 188884, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 363, p. 179-187, 1998.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-289, 1997a.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 235, p. 73-76, 1997b.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, p. 331-337, 2001

SAYAR, K.; MELLI, M. Effect of combination of misoprostol and indomethacin on eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 369, p. 365-371, 1999.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.8, p.93-131. 2006.

SCHRAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflamm. Res.**, v.53, p. 644-652, 2004

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v. 18, p. 439-446, 1986.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora**. 1996. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1996.

SETTY, A. R.; SIGAL, L. H. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 773 – 784, 2005

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, C. S.; CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecnomed, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.**, v. 897, p. 9-19, 2001.

SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, p. 377-380, 1988.

SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97–103, 1985.

SOUSA, F. C.; LEITE, C. P.; MELO, C. T.; ARAÚJO, F. L.; GUTIERREZ, S. J.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.B. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 1212-1216, 2007.

SPISANI, S.; PARESCHI, M. C.; BUZZI, M.; COLAMUSSI, L.; BIONDI, C.; TRANIELLO, S.; ZECCHINI, G. P.; PARADISI, M. P.; TORRINI, I.; FERRETTI, M. E. Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. **Cell Signal**, v. 8, p. 269- 277, 1996.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 31, p. 445-451, 1988.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; TOMIC, M. A.; VUCKOVIC, S. M.; PARANOS, S.; UGRESIC, N. D.; PROSTRAN, M. S.; MILOVANOVIC, S.; BOSKOVIC, B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth. Analg.**, v. 106, p. 1897-1903, 2008.

STERANKA, L. R.; BURCH, R. M. Bradykinin antagonists in pain and in inflammation. In: BURCH, R. M. (Ed.). **Bradykinin Antagonists: Basic Clinical Research**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 171-189.



STERANKA, L. R.; MANNING, D. C.; HAAS, C. J.; FERKANY, J. W.; BOROSKY, S. A.; CONNOR, J. R.; VAVREK, R. J.; STEWART, J. M.; SNYDER, S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 3245–3249, 1988.

SWEITZER, S. M.; ALLEN, C. P.; ZISSEN, M. H.; KENDIG, J. J. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. **Pain**, v. 110, p. 269–280, 2004.

SYRIATOWICZ, J. P.; HU, D.; WALKER, J. S.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, v. 94, p. 587–594, 1999.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Adv. Pharmacol.**, v. 24, p. 123–155, 1993.

TEIXEIRA C. P. L.; MELO C T V, ARAÚJO F. L. O.; A. M. R. CARVALHO, M. I. G SILVA, J. M. BARBOSA-FILHO, D. S. MACEDO, G. S. B. VIANA, F. C. F. SOUSA. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Aug. 2011. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x.

TEOH, H.; MALCANGIO, M.; FOWLER, L. J.; BOWERY, N. G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not  $\gamma$ -aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 302, p. 27–36, 1996.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 15–17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: BESSON, M.J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 21–41.

TOMLINSON, A.; APPLETON, I.; MOOREGILROY, A. R.; WILLIS, D.; MITCHELL, J. A.; WILLOUGHBY, A. Cyclo-oxygenase and nitric oxide isoforms in rat carrageenan-induced pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 693–698, 1994.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531–543, 1998.

TOTANI, T.; TAKETANI, Y.; UEDA, N.; NISHISHO, T.; OHMOTO, Y.; SAKATA, Y.; MURAGUCHI, M.; WADA, K.; YAMAMOTO, S. Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. **J. Neurochem.**, v. 72, p. 302–309, 1999.

TURNBACH, M. E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E2 or zymosan in the rat. **Pain**, v. 97, p. 127–137, 2002.

TYSON, J.J.; CHEN, K.; NOVAK, B. Network dynamics and cell physiology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 908–916, 2001.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and ciclooxigenases in spinal. **Prog. Neurobiol.**, v. 64, p. 327-363, 2001.

VIANNA, R. M.; CALIXTO, J. B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-BK in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, v. 23, p. 281-291, 1998.

VICENTINI, A.; WERFF, H. V. D.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A. (Ed.). **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA – DFID, 1999. v. 1, p. 150-179.

VIEIRA, C. M.; VAZ, A. M. S. F.; LIMA, H. C. **Espécies de interesse conservacionista na Reserva ecológica de Macaé de Cima**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997.

VIVIER, E.; MALISSEN B.. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 17-21, 2005.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 349 – 374, 2000.

WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Principios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Coogan, 2004. p. 294-295.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: **International series of Monographs in Pure and Applied Biology, Modern Trends in Physiological Sciences.**, v. 37, p. 1-47, 2006.

WERFF, H. WAN DER; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 8, p. 419 – 432, 1996.

WILLOUGHBY, D. A. In vivo models of inflammation. **Methods Mol. Biol.**, v. 225, p. 109 – 113, 2003.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced edema in the hind paw of the rats as an assay anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 7, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000

YAMAGUCHI, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURAIISHI, Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT<sub>2</sub> receptors in mice. **Neurosci. Res.**, v. 35, p. 77-83, 1999.

YANG, L. C.; MARSALA, M.; YAKSH, T. L. Characterization of spinal cord aminoacids, citrulline and PGE2 release after carragenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. **Pain**, v. 67, p. 345-354, 1996.

YASHPAL, K.; PITCHER, G. M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T. J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 3263-3272, 1995.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J.B. Ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 356, p. 101-114, 1995.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 413-421, 2001.