

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Ubirajara Duarte dos Santos

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO**

Florianópolis
2013

Ubirajara Duarte dos Santos

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Ubirajara Duarte dos
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO / Ubirajara Duarte dos
Santos ; orientador, Adair Roberto Soares dos Santos -
Florianópolis, SC, 2013.
110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências


1. Neurociências. 2. Neurociências. 3. Ácido
Rosmarínico. 4. Dor. 5. Antinociceptivo. I. Santos, Adair
Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.
Título.

UBIRAJARA DUARTE DOS SANTOS


**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E
ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO”.**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 23 de outubro de 2013.

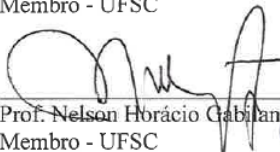

Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC


Prof. Everson Araújo Nunes
Membro - UFSC


Prof. Felipe Meira de Faria
Membro da Banca Externo


Prof. Nelson Horácio Gabilan
Membro - UFSC


Prof. Rodrigo R. Resende
Membro da Banca Externo


Profa. Tânia Silvia Fröde
Membro – UFSC

*Dedico essa tese à minha mãe que torceu,
rezou e sobreviveu para ver o término dessa
difícil jornada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido amigos que eu nunca imaginei ter, pela força, coragem e fé para superar as dificuldades que surgiram ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

A minha família na terra e no céu.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela paciência, respeito, ensinamentos e confiança em meu trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Neurociências da UFSC.

Aos colegas e amigos do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI): Maria Fernanda, Tati, Cris Baggio, Marina, Débora, Tátilla, Morgana, Ana, Rodrigo, Dani Taga, Cris Setim, Ney, Vini, Wladimir, Deise, Gaúcho, Denise, Murilo, Igor, Tayrine, Serginho, Chico, Fran e Nêne pela companhia alegre e pela amizade.

Gostaria de agradecer especialmente meus ex-alunos e amigos, Daniel e Leidiane, por terem me ajudado substancialmente na realização dos trabalhos. E aos trabalhadores da última hora, Adny e Rafael. Jamais me esquecerei de vocês.

Aos funcionários desta Universidade em especial o Seu Carlos e Dona Vilma, sempre prontos a nos auxiliar e também por tornarem os nossos dias mais alegres e descontraídos.

“Nunca o que eu tenho será tão pouco que eu não possa dividir.”

Autor desconhecido

RESUMO

O ácido rosmarínico (AR) é um polifenol derivado do ácido cafêico e do ácido 3,4-dihidroxifenilacético encontrado em várias plantas como, por exemplo, a melissa (*Melissa officinalis*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a sálvia (*Salvia officinalis*) e possui potencial para a fabricação de um fitoterápico, tendo em vista seus efeitos farmacológicos observados em diversos estudos *in vivo* e *in vitro*. O objetivo deste estudo foi de verificar o efeito do AR na dor aguda e crônica de origem inflamatória e neuropática, respectivamente, além de investigar os mecanismos de ação envolvidos neste efeito. O AR administrado via intragástrica, (i.g.) promoveu redução significativa da nocicepção aguda induzida pelo ácido acético, glutamato e formalina (na segunda fase do teste da formalina) em camundongos. O efeito antinociceptivo do AR envolve o sistema serotoninérgico, uma vez que sua ação foi revertida pelo PCPA (p-clorofenilalanina, inibidor da síntese de 5-HT), mas não o sistema opióide e noradrenérgico tendo em vista que seu efeito antinociceptivo não foi alterado pela naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) e o AMPT (alfa-metil-p-tirosina, inibidor da síntese de noradrenalina), respectivamente. O AR também apresentou efeito antinociceptivo em modelos de dor crônica, sendo capaz de reduzir de forma dependente da dose a hiperalgesia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático (modelo de dor neuropática), pelo CFA (modelo de dor inflamatória crônica) e no modelo de dor pós-isquemia crônica. Em adição, o AR administrado i.g. inibiu significativamente a nocicepção induzida pela injeção intratecal de NMDA, TNF- α e IL-1 β sem causar alteração da atividade locomotora dos animais, mas não inibiu a resposta causada pelo AMPA, cainato e Trans-ACPD. Além disso, o AR apresentou atividade anti-inflamatória no modelo da peritonite induzida pela carragenina, avaliada pela diminuição de leucócitos totais, de neutrófilos, da atividade da mieloperoxidase, do extravasamento de proteínas e das concentrações de TNF- α e IL-1 β na cavidade peritoneal de camundongos. O presente trabalho demonstrou que o AR exerce um importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos de dor e inflamação aguda e crônica e seu mecanismo de ação parece envolver, pelo menos em parte, a ativação do sistema serotoninérgico e a inibição dos receptores ionotrópicos (tipo NMDA) para glutamato e da via de sinalização dependente das citocinas pró-inflamatórias. Assim, o AR pode se tornar uma substância útil para o desenvolvimento de fármacos de interesse terapêutico no controle da dor e inflamação aguda e crônica.

ABSTRACT

Rosmarinic acid (RA) is a polyphenol derived from caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid found in various plants such as melissa (*Melissa officinalis*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*) and has potential for manufacturing a phytotherapeutic, considering their pharmacological effects observed in several *in vitro* and *in vivo* studies. The objective of this study was to verify the RA effect in acute and chronic pain of neuropathic and inflammatory origin, respectively, in addition to investigate the mechanisms of action involved in this effect. The RA administered intragastrically (i.g.) promoted a significant reduction in the nociception induced by acetic acid, glutamate and formalin (in the second phase of the formalin test) in mice. The antinociceptive effect of RA involves the serotonergic system, since its action was reversed by the PCPA (p-chlorophenylalanine, serotonin synthesis inhibitor), but not the opioid system and noradrenergic, considering that its antinociceptive effect was not changed by naloxone (non-selective antagonist of opioid receptors) and AMPT (alpha-methyl-p-tyrosine, norepinephrine synthesis inhibitor), respectively. The RA also showed antinociceptive effect in models of chronic pain, being able to reduce the dose-dependent mechanical hyperalgesia induced by partial constriction of sciatic nerve (model of neuropathic pain), CFA (chronic inflammatory pain model) and at the post-ischemic chronic pain model. In addition, the RA administered i.g. significantly inhibited nociception induced by intrathecal injection of NMDA, TNF- α and IL-1 β without causing alteration of locomotor activity of animals, but not inhibited the response caused by AMPA, kainate and trans-ACPD. Furthermore, the RA has anti-inflammatory activity in the model of carrageenan-induced peritonitis, evaluated by the decrease of total leukocytes, neutrophils, myeloperoxidase activity, protein extravasation and concentrations of TNF- α and IL-1 β into the peritoneal cavity of mice. The present study demonstrated that RA exerts an important antinociceptive and anti-inflammatory effect in models of acute and chronic pain and inflammation and its mechanism of action seems to involve, at least in part, the serotonergic system activation and inhibition of ionotropic receptors (NMDA) of glutamate and the signaling pathway of pro-inflammatory cytokines. Thus, the RA can become a useful substance for the development of therapeutic interest in controlling pain and acute and chronic inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via nociceptiva ascendente.....	32
Figura 2 – Migração de neutrófilos.....	35
Figura 3 – Ácido rosmarínico.....	37
Figura 4 – Plantas que contem ácido rosmarínico.....	39
Figura 5 – Efeito do AR administrado pela via i.g. na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	61
Figura 6 - Efeito do AR na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	62
Figura 7 - Efeito do AR na nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	63
Figura 8 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica no modelo da LNPC.....	65
Figura 9 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA.....	67
Figura 10– Efeito do AR na hiperalgesia mecânica inflamatória no modelo da DPIC.....	68
Figura 11 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica neuropática no modelo da DPIC.....	69
Figura 12 – Efeito do AR sobre o sistema glutamatérgico.....	71
Figura 13 – Efeito do AR sobre as citocinas pró-inflamatórias.....	72
Figura 14– Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do AR.....	73
Figura 15 – Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do AR.....	74
Figura 16 – Participação do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do AR.....	75
Figura 17 – Efeito do AR no modelo da peritonite induzida pela carragenina.....	76
Figura 18 – Efeito do AR sobre as citocinas inflamatórias e atividade da mieloperoxidase no modelo da peritonite induzida pela carragenina.....	77
Figura 19 – Efeito do AR sobre a atividade locomotora no modelo do campo aberto.....	78
Figura 20– Mecanismos de ação farmacológicos do AR encontrados neste estudo.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos farmacológicos do AR.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIED - Associação Internacional para o Estudo da dor;
AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico;
AMPT - alfa-metil-para-tirosina;
AR - ácido rosmarínico;
CCK - colecistocinina;
CFA - adjuvante completo de Freund;
CGRP - peptídeo relacionado ao gene de calcitonina;
DPIC - dor pós isquemia crônica;
ERK - cinaserelacionada a sinais extracelulares;
ERNs - espécies reativas de nitrogênio;
EROs - espécies reativas de oxigênio;
GDNF- fator neurotrófico derivado de células gliais;
GRD - gânglio da raiz dorsal;
HMGB1 - grupo de proteína B 1 de alta mobilidade;
5-HT - serotonina;
i.g.- intragástrica;
i.p. - intraperitoneal;
i.pl. - intraplantar/intradérmica;
i.t. - intratecal;
i.v. - intravenosa;
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor;
IB4 - isolectina B4;
iGluR - receptor ionotrópico de glutamato;
IL-1 β - interleucina 1- beta;
(JNK) - cinase terminal c-Jun
LC - locus coeruleus;
LPNC - ligação parcial do nervo ciático;
LTB4 - leucotrieno B4;
MAO - monoamina oxidase;
(RS)-MCPG - (RS)- α -metil-4-carboxifenilglicina;
mGluR - receptor metabotrópico de glutamato;
MPO - mieloperoxidase;
MyD88 - fator de diferenciação mielóide 88;
NaV1.7 - canal de sódio controlado por voltagem alfa VII;
NGF - fator de crescimento do nervo;
NMDA - N-metil-D-aspartato;
NO - óxido nítrico;
NOS - óxido nítrico sintase;
OMS - organização mundial da saúde;

p38 - proteína cinase p38;
PAF - fator de ativação plaquetária;
PAG - substância cinzenta periaquedutal;
PCPA - p- clorofenilalanina metil éster;
PGs - prostaglandinas;
PGE₂- prostaglandina E2;
PKC - proteínacina C;
RVM - bulbo (medulla) rostro ventral;
s.c. - subcutânea;
SCN9A - gene subunidade alfa do canal de sódio dependente de
voltagem do tipo 9;
SNC - sistema nervoso central;
SP - substância P;
TIRAP - molécula adaptadora associada ao Toll-like;
TLR - receptores do tipo Toll (Toll-like);
TNF- fator de necrose tumoral α ;
Trans-ACPD - ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico;
TRIF - Adaptador contendo domínio TIR, induzido por interferon- β ;
ATP - Trifosfato de adenosina;
trkA - receptores de neurotrofina tirosina cinase A;
UVA - ultravioleta do subtipo A;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 DOR.....	27
1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO	33
1.3 PRODUTOS NATURAIS.....	36
1.3.1 Ácido Rosmarínico	37
2 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 FÁRMACOS E REAGENTES	49
3.2 ANIMAIS.....	49
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA.....	50
3.3.1 Contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.	50
3.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos	50
3.3.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos	51
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA.....	52
3.4.1 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático (LNPC)	52
3.4.2 Nocicepção inflamatória crônica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA).....	53
3.4.3 Dor crônica induzida pelo modelo da síndrome da dor complexa regional (SDCR)	53
3.5 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	54
3.5.1 Avaliação da participação do sistema glutamatérgico.....	54
3.5.2 Avaliação da participação das citocinas pró-inflamatórias....	55
3.5.3 Avaliação do envolvimento do Sistema Opióide.....	56
3.5.4 Avaliação do envolvimento do Sistema Serotoninérgico	56
3.5.5 Avaliação do envolvimento do Sistema Noradrenérgico	56

3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	57
3.6.1 Peritonite induzida por carragenina	57
3.6.1.1 Contagem dos leucócitos peritoneais	57
3.6.1.2 Determinação das concentrações de citocinas	58
3.6.1.3 Quantificação da mieloperoxidase (MPO).....	58
3.6.1.4 Extravasamento Celular	58
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA.....	59
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
4 RESULTADOS.....	61
4.1 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDA	61
4.1.1 Contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.	61
4.1.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.	62
4.1.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.	62
4.2 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA	63
4.2.1 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor neuropática induzida pela constrição parcial do nervo ciático	63
4.2.2 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor inflamatória induzida pelo CFA	66
4.2.3 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor inflamatória e neuropática induzida no modelo de dor pós isquemia crônica (DPIC)	66
4.3 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO	70
4.3.1 Efeito do ácido rosmarínico na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos.....	70
4.3.2 Efeito do ácido rosmarínico na nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias.....	71
4.3.3 Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico	72
4.3.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico.....	73
4.3.5 Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico.....	74

4.4 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA PERITONITE CAUSADA PELA CARRAGENINA.....	75
4.5 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR NO TESTE DE ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA.....	77
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÕES	91
7 REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

O prazer e a dor são considerados as duas principais emoções que ocorrem tanto em humanos quanto em outros animais. De fato, o prazer para diferentes atividades é o que animais e humanos procuram diariamente, enquanto que a dor normalmente é evitada por ambos (ZHUO; WU; WU, 2011). A dor faz parte do sistema de defesa e serve como mecanismo protetor para sobrevivência do organismo, facilitando a rápida retirada de uma situação de dano (reação reflexa), salvaguardando a parte do corpo afetada enquanto ela cicatriza e também fornece um forte sinal de aprendizado, que permite identificar e, principalmente, evitar lesões no futuro (COX et al., 2010). Neste sentido, a dor normalmente é considerada como uma experiência multidimensional complexa e subjetiva porque envolve a ativação de componentes sensoriais/discriminativos, motivacionais/afetivos e cognitivos/avaliativos (NAVRATILOVA et al., 2013).

A habilidade em detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem estar do organismo. Isto pode ser dramaticamente ilustrado pelo acompanhamento de indivíduos que sofrem de insensibilidade congênita à dor, em geral desencadeada por uma mutação no gene SCN9A, localizado no braço longo do par cromossômico 2, que expressa os canais de sódio sensíveis à voltagem $Na_v1.7$ (MANFREDI et al., 1981). Esta mutação torna estes indivíduos incapazes de detectar estímulos dolorosos. Estas pessoas, por exemplo, não sentem a dor devido à perfuração por objetos cortantes, nem a dor causada por uma chama, nem sequer a dor associada a lesões internas, tais como uma fratura óssea. Desta forma, pessoas com esta mutação não possuem uma resposta apropriada diante de certas condições, podendo inclusive ameaçar a sobrevivência destes indivíduos (BASBAUM et al., 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (AIED) definiu a dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões” (apud LOESER; TREEDE, 2008).

A dor pode ser classificada de acordo com a origem, ou de acordo com a duração. Quanto à duração, a dor pode ser considerada *aguda*, decorrente de ativação rápida e transitória dos nociceptores após um estímulo nocivo, ou *crônica*, quando persiste por semanas ou meses, muitas vezes permanecendo mesmo após a recuperação da lesão inicial

(LOESER; MELZACK, 1999). Com relação à origem, a dor pode ser classificada como *nociceptiva*, ocorrendo por ativação direta e/ou excessiva de nociceptores (receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos) ou *neuropática*, que ocorre como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afete o sistema somatosensorial, seja em nível periférico ou central. Há ainda a dor de origem *inflamatória*, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios, levando a situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente a um estímulo nocivo, ou alodínia, caracterizada pela sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos não nocivos (MILLAN, 1999; LOESER; TREEDE, 2008).

Por sua definição, a dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução do estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Em outras palavras, a percepção da dor envolve o componente fisiológico – a *nocicepção* – determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias e a transmissão do impulso nociceptivo até o sistema nervoso central, e os componentes emocionais, afetivos, culturais e psicológicos. Desta forma, o termo *dor* é apropriado quando relacionado aos seres humanos, que são capazes de expressar tais componentes emocionais. Em modelos experimentais com roedores, a dor sentida pelos animais também envolve diversos aspectos, e embora vários trabalhos venham demonstrando metodologias para avaliação desse componente “emocional” em animais, os modelos clássicos de investigação de nocicepção permitem avaliar com relativa precisão e reprodutibilidade apenas o seu componente fisiológico. Neste sentido, nos modelos onde se avalia apenas o componente sensorial, considera-se mais apropriado utilizar o termo *nocicepção* (BARROT, 2012).

Desde a antiguidade as ideias relacionadas à dor foram bastante diversificadas. Na Grécia antiga, foi Aristóteles (384-322 a.C.) quem contribuiu significativamente com o futuro entendimento sobre as sensações. Aristóteles entendia o tato como sendo um dos cinco sentidos principais, junto com a visão, olfato, audição e paladar, e acreditava que o tato estava diretamente relacionado à sensação de dor, reconhecendo sua direta correlação com um dano tecidual. Seguindo essa linha, Herophilus (335-280 a.C.) propunha ser o cérebro o órgão responsável pela consciência e sensações, reconhecendo que nervos periféricos seriam a ligação com a medula espinal, controlando as sensações e os movimentos, ideia que foi mais tarde confirmada por Galeno (130-201)

(KEELE, 1957¹ *apud* PERL, 2007). No entanto foi Avicenna (980-1037), filósofo e fisiologista persa, quem relatou que em condições de doença, a dor poderia ser dissociada do reconhecimento do tato e temperatura, propondo então que a dor seria uma sensação independente (PERL, 2007).

A partir dos anos 1800, muitas teorias a respeito do processamento da dor foram propostas. Charles Bell, em 1811, formulou a ideia de que os nervos sensoriais eram especializados em sua função, ou seja, adaptados para detectar e transmitir a informação gerada por um determinado estímulo. Nos anos 1880, várias propostas já suportavam o papel essencial de um mecanismo espinal de condução da informação gerada por um estímulo doloroso. Em 1906, Sherrington, verificou que a dor era, na maior parte das vezes, originada de uma lesão tecidual. A partir desta constatação, ele sugeriu classificar os estímulos capazes de gerar lesão tecidual como estímulos “nocivos” e que a sinalização dos eventos nocivos chamada de “nocicepção” seria feita pelos órgãos dos sentidos responsáveis pela dor (PERL, 2007). A partir daí iniciou-se uma intensa busca pelo entendimento dos processos envolvidos na transdução, transmissão e percepção da dor, sendo relatados inúmeros estudos que culminam com os conhecimentos atuais.

De acordo com a proposta de Sherrington², os nociceptores compreendem as terminações nervosas de neurônios sensoriais primários, que podem ser ativados por estímulos capazes de causar dano tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001); de acordo com a definição da IASP os nociceptores são “receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos” (LOESER; TREEDE, 2008). De fato, atualmente já está bem estabelecido o conceito de que existem neurônios sensoriais primários que podem ser estimulados por frio ou calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes, mas não por estímulos inócuos como o tato ou calor não-nocivo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Essa diferença no padrão de ativação leva, portanto, ao conceito de que existem diferentes tipos de fibras sensoriais, responsáveis por diferentes padrões de transmissão do estímulo nociceptivo, cujas terminações não apresentam uma localização anatômica única, mas ao contrário, são distribuídas por todo o organismo, intervando a pele, músculos, articulações e vísceras (BASBAUM et al., 2009).

¹Keele, K.D., 1957. *Anatomies of Pain*. Charles C Thomas, Springfield, IL.

²Sherrington, C.S., 1906. *The Integrative Action of the Nervous System*. Scribner, New York.

As fibras sensoriais são provenientes de corpos celulares localizados no gânglio trigeminal (GT) ou no gânglio da raiz dorsal (GRD), inervando a região da face ou do corpo, respectivamente (BASBAUM et al., 2009). Já as fibras aferentes vagais, que inervam tecidos viscerais, possuem seus corpos celulares nos gânglios nodoso (GN) e jugular (GJ) (BLACKSHAW et al., 2011). As fibras sensoriais possuem tanto um ramo axonal periférico, inervando tecidos periféricos, quanto um ramo axonal central, fazendo a conexão com a medula espinal (BASBAUM et al., 2009), e são classificadas em três grupos, com base em critérios anatômicos e funcionais. As fibras do tipo A β , mielinizadas e de maior diâmetro, são responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos inócuos, estando relacionadas ao tato e propriocepção, enquanto as fibras do tipo A δ e C, que possuem axônios não mielinizados, de pequeno diâmetro, estão relacionadas à detecção de estímulos nocivos e à nocicepção (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009).

Desta forma, os nociceptores são extremamente heterogêneos, diferindo quanto aos tipos de neurotransmissores que contêm, os receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação ou lesão (STUCKY; GOLD; ZHANG, 2001). Existem duas classes principais de nociceptores que respondem às diferentes modalidades de estímulos nocivos, sejam eles químicos, térmicos ou mecânicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O maior grupo de nociceptores são os chamados de fibras do tipo C, que conduzem lentamente e que respondem aos estímulos nocivos térmicos. Existem duas populações de fibras C, uma chamada de fibras peptidérgicas que contém uma variedade de neuropeptídeos, incluindo substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e que expressam receptores de neurotrofina tirosina cinase A (trkA), os quais respondem ao fator de crescimento do nervo (NGF), e outra, a população de fibras não-peptidérgica que expressam o receptor de neurotrofina c-Ret que é alvo do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e um grupo de carboidrato de superfície que se liga seletivamente a uma lectina de planta chamada isolectina B4 (IB4) (BASBAUM et al., 2009).

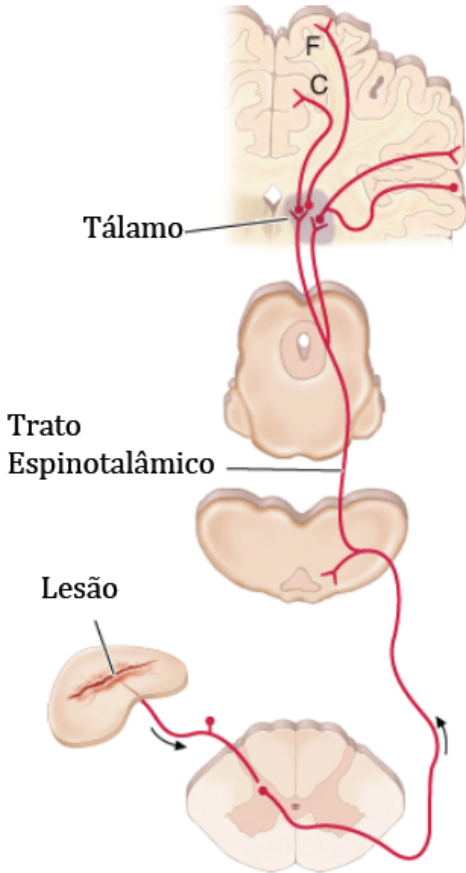
O segundo maior grupo de nociceptores são fibras de diâmetro médio e pouco mielinizadas, as fibras A δ (WOLF; MA, 2007). Esses nociceptores conduzem mais rapidamente do que as fibras do tipo C não mielinizadas, sendo divididas também em duas populações. Ambas

respondem a estímulos mecânicos intensos, porém respondem de forma diferenciada ao calor intenso (as do tipo I são ativadas pela temperatura de 53°C; e as do tipo II ativadas pela temperatura de 43°C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). As fibras A δ diferenciam-se das fibras A β , que são de grande diâmetro, de condução rápida e respondem à estimulação mecânica inócua (BASBAUM et al., 2009).

Há ainda mais uma categoria de nociceptores caracterizados por possuírem propriedades únicas. São chamados nociceptores "silenciosos" que, tipicamente, não respondem a intensidades nocivas de estimulação mecânica, exceto em faixas extremas de intensidade. Apesar de nociceptores silenciosos serem difíceis de ativar dentro da faixa normal de intensidade de estímulos nocivos, após uma lesão tecidual, estes nociceptores são ativados em resposta a alguns mediadores químicos endógenos associados com a lesão do tecido. Nociceptores silenciosos são tipicamente associados com o aumento da atividade espontânea e a capacidade de resposta aos estímulos nocivos e até mesmo inócuos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O sinal de dor é transmitido a várias estruturas do SNC que exercem controle sobre a sinalização da dor por meio de projeções descendentes que inibem ou amplificam a excitabilidade das vias nociceptivas ascendentes. As fibras sensoriais primárias que conduzem os estímulos dolorosos possuem seus corpos celulares localizados no gânglio espinal e suas terminações centrais entrando na medula espinal pelo corno posterior, onde fazem sinapses do lado ipsilateral a sua entrada com neurônios de segunda ordem os quais cruzam a medula espinal e ascendem para o encéfalo via trato espinotalâmico. Estes neurônios de segunda ordem fazem sinapse no tálamo (diencéfalo) com neurônios de terceira ordem. Os neurônios de terceira ordem se projetam para o córtex somatossensorial primário via cápsula interna. Estes neurônios também possuem projeções axonais que alcançam estruturas do sistema límbico tais como giro do cíngulo, hipocampo e amígdala, que são responsáveis pelas respostas emocionais a dor (Figura 1) (GARLAND, 2012).

Figura 1 – Via nociceptiva ascendente.



Adaptado de **Harrison's Manual of Medicine, 2012**

Legenda: Representação esquemática de uma via nociceptiva ascendente.

O organismo possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor por meio da via descendente que envolve uma série de estruturas encefálicas, como o córtex cerebral, hipotálamo, amígdala, locus coeruleus (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), entre outros, bem como sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, adenosinérgico, além de canabinóides entre outras substâncias (MILLAN, 2002).

Apesar de todo o conhecimento acerca da dor, de como ela se processa, das vias que a transmitem e dos neurotransmissores envolvidos, é ainda difícil determinar, investigar, conduzir e tratar este sintoma que acompanha inúmeras doenças (TRACEY; MANTYH, 2007).

Juntamente com o rubor, o edema e o calor, a dor é também um dos sinais cardinais da inflamação e muitos dos processos dolorosos revisados anteriormente decorrem de um processo inflamatório.

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo imunológico complexo pelo qual o corpo responde a uma infecção ou lesão por bactérias, vírus ou outros agentes químicos ou físicos. Durante a inflamação aguda, proteínas séricas e leucócitos movem-se da corrente sanguínea para o meio extravascular gerando as características clínicas da inflamação conhecida como rubor, calor, edema, dor e perda de função (YOON; BAEK, 2005). Existem dois estágios da inflamação, o agudo e o crônico. A inflamação aguda é um estágio inicial, o qual é mediado por meio da ativação das células do sistema imunitário, leucócitos, macrófagos e linfócitos. Este tipo de inflamação persiste por um curto período de tempo e é, normalmente, benéfica ao organismo (NATHAN, 2002). Se a inflamação dura por um período maior, semanas ou meses, o segundo estágio da inflamação que é chamado de inflamação crônica se instala, e predispõe o organismo a uma série de doenças como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso sistêmico (RICKLIN; LAMBRIS, 2013).

A inflamação aguda promove alterações fisiológicas que envolvem uma sequência de eventos, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs), necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios como as citocinas fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (HUERRE; GOUNON, 1996; VIVIER; MALISSEN, 2005). A dor aparece devido aos efeitos diretos de mediadores resultantes tanto do dano inicial quanto da resposta inflamatória em si, como pela compressão dos nervos sensoriais ocasionada pelo edema local.

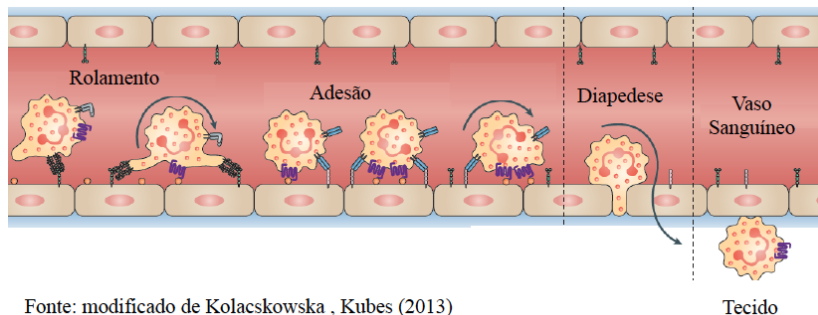
A vasodilatação, responsável pelo calor e rubor, é um fenômeno clássico associado à inflamação que facilita a liberação de mediadores e células inflamatórias para o local lesionado. Os principais mediadores

envolvidos nesse processo são o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGs) vasodilatadoras entre outros peptídeos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Um importante fenômeno atribuído à vasodilatação e ao extravasamento plasmático é o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório. A ativação do endotélio nos vasos sanguíneos permite o extravasamento seletivo de neutrófilos, e ao mesmo tempo previne a saída dos eritrócitos. Esta seletividade ocorre devido a ligação de selectinas celulares e endoteliais com as integrinas e receptores de quimiocinas nos leucócitos, que ocorre na superfície do endotélio, bem como nos espaços extravasculares, onde as proteínas plasmáticas recém depositadas formam uma matriz provisória, constituída principalmente por glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, para ligação das integrinas dos leucócitos (MEDZHITOV, 2008). A transmigração dos neutrófilos ocorre através da marginação (movimentação do neutrófilo do centro para a periferia do vaso), rolamento (desaceleração do neutrófilo pela ligação com moléculas de adesão chamadas selectinas), adesão, com moléculas de adesão do tipo integrinas e da superfamília das imunoglobulinas, e diapedese (o neutrófilo atravessa o endotélio através de junções entre as células) (MARSHALL et al., 2003).

Os leucócitos necessitam de moléculas quimioatraentes para migrar para o sítio inflamatório. Entre essas moléculas encontram-se: bioprodutos de bactérias, componentes do sistema complemento, quimiocinas, leucotrieno B4 (LTB4) e fator de ativação plaquetária (PAF) (SIMON; GREEN, 2005). Quando os neutrófilos atingem o foco inflamatório, tornam-se ativados e tentam eliminar o patógeno liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais incluem EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), proteinases, catepsinas, elastases, mieloperoxidase, entre outros (MEDZHITOV, 2008).

Figura 2 – Migração de neutrófilos.



Fonte: modificado de Kolaczkowska, Kubes (2013)

Legenda 2: Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sanguínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os neutrófilos fagocitam e destroem as bactérias.

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de resolução e reparo, a qual é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Se a inflamação aguda falha em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e, no caso de infecção, também por células T. Se o efeito combinado dessas células ainda continua insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas e tecidos linfoides terciários (MEDZHITOV, 2008).

Existem vários modelos animais de inflamação e entre eles está o modelo da peritonite induzida pela carragenina. A peritonite induzida pela carragenina é um modelo experimental de inflamação aguda amplamente utilizada para testar novas terapias anti-inflamatórias, a qual permite ao pesquisador quantificar ou analisar a permeabilidade vascular e a migração celular, bem como, mudanças nos parâmetros inflamatórios como a produção de citocinas pró-inflamatórias (BEEKHUIZEN; VAN FURTH, 1993; DOWNEY; FIALKOW; FUKUSHIMA, 1995; DA SILVA et al., 2011).

Devido o grande impacto social e econômico das doenças inflamatórias, os fármacos anti-inflamatórios atuais têm várias limitações no concerne a sua eficácia, efetividade, segurança e custo de produção. Portanto, esforços para desenvolver novos e seguros agentes

anti-inflamatórios são urgentes, e os mediadores envolvidos na inflamação são potenciais alvos terapêuticos.

1.3 PRODUTOS NATURAIS

Desde a antiguidade, os produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, têm constituído importante fonte de agentes terapêuticos. Os costumes populares, no que diz respeito à utilização e a eficácia de plantas medicinais, vêm contribuindo ao longo dos anos de forma significativa para a divulgação das prováveis ações terapêuticas das plantas, prescritas com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus efeitos cientificamente comprovados (CALIXTO, 2000; CALIXTO et al., 2001). Outro aspecto importante é que a terapêutica atual, constituída por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais (CALIXTO et al., 2001).

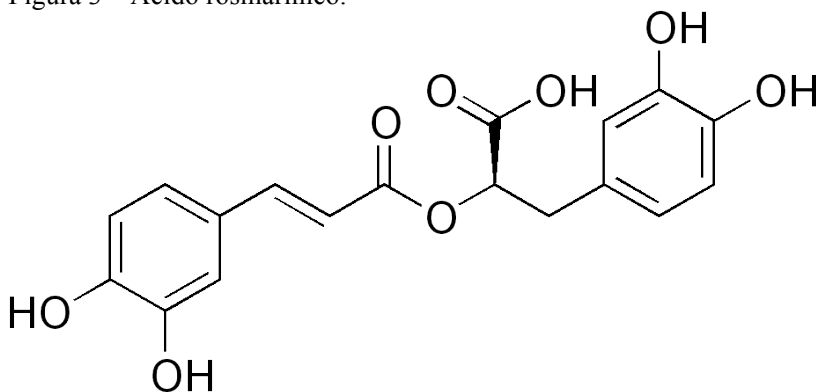
A disponibilidade de princípios ativos quimicamente puros, juntamente aos avanços obtidos na fisiologia experimental no século XIX, possibilitou a descrição de alguns dos efeitos destas substâncias, bem como a investigação de seu mecanismo de ação. É possível citar, por exemplo, a atropina, princípio ativo isolado da planta *Atropa belladonna*, que contribuiu para a fundamentação da neurotransmissão colinérgica e para a teoria dos receptores farmacológicos; e a reserpina, princípio ativo extraído da planta *Rauwolfia serpentina*, que propiciou o embasamento da neurotransmissão adrenérgica, serotoninérgica e dopaminérgica. Outros princípios ativos que seguem a linha da atropina e reserpina são o curare (isolado de *Chondodendron tomentosum*), nicotina (espécies de *Nicotiniana*), ergotamina (espécies do Ergot), cocaína (espécies de *Erythroxylum*), morfina (*Papaver somniferum*), glicosídeos cardíacos (espécies de *Digitalis*), efedrina (*Ephedra sinica*); além de uma diversidade de outros princípios ativos isolados de plantas como o ácido salicílico, com efeito analgésico, anti-inflamatório e inibidor da agregação plaquetária, proveniente da planta *Salix alba* (FARNSWORTH, 1966; GILANI; RAHMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008).

Apesar dos avanços das indústrias química e farmacêutica, ainda hoje a medicina tradicional baseada em plantas medicinais constitui-se um importante pilar do sistema de saúde, uma vez que dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que a maioria da população de países em desenvolvimento depende essencialmente das

plantas como atenção primária à saúde, devido à falta de acesso aos medicamentos modernos (CALIXTO et al., 2005). Para os países em desenvolvimento, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados com ação terapêutica comprovada e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros, facilitando ainda o crescimento da fitomedicina nacional e assim, apresentando impacto na economia local (ELIZABETSKY; WANNMACHER, 1993). O Brasil é o país que detém a maior biodiversidade do mundo, avaliada em aproximadamente 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos do planeta. Contudo, estima-se que não mais que 10% das espécies de plantas ou de seus produtos tenham sido objeto de investigação científica (CALIXTO et al., 2005). Com isso, é crescente a importância da pesquisa sobre novos compostos de interesse terapêutico a partir de recursos da biodiversidade brasileira, impulsionando o desenvolvimento da indústria nacional, o crescimento da fitoterapia no país e principalmente trazendo benefícios para a população brasileira no que diz respeito à aquisição de medicamentos com eficácia comprovada.

Dentre várias substâncias provenientes de plantas medicinais que possuem potencialidade para o desenvolvimento de um fitomedicamento, pode-se citar o ácido rosmarínico (Figura 3).

Figura 3 – Ácido rosmarínico.



Legenda: Estrutura molecular do ácido rosmarínico.

1.3.1 Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico foi isolado pela primeira vez em 1958 por Scarpati e Oriente, a partir das folhas de *Rosmarinus officinalis* L., de onde surgiu o nome da substância. Mais tarde, este mesmo composto foi

encontrado em diversas espécies das famílias Lamiaceae e Boraginaceae. Sua estrutura foi descrita como um éster do ácido caféico e do ácido 3,4-dihidroxifenilático (SCARPATI; ORIENTE, 1958). Este derivado do ácido caféico apresenta uma série de atividades biológicas, como a atividade antioxidante e anti-inflamatória, já descritas por alguns autores (PETERSON; SIMMONDS, 2003; JIANG et al, 2009).

Além disto, o ácido rosmarínico também está presente em outras famílias de plantas como as Blechnaceae (samambaias), as Zosteraceae, as Potamogetonaceae e as Cannaceae (PETERSON; SIMMONDS, 2003). Dentre as várias espécies vegetais que contém o ácido rosmarínico destacam-se: *Borago officinalis* (borragem), *Glechoma hederacea* (erva-terrestre), *Hyssopus officinalis* (hissopo), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Lippia alba* (erva cidreira, chá de tabuleiro), *Lippia citriodora* (verbena), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Lippia organoides* (salva de Marajó), *Majorana hortensis* (manjerona), *Melissa officinalis* (melissa), *Mentha arvensis* (hortelã), *Mentha piperita* (hortelã pimenta), *Mentha spicata* (hortelã-peluda), *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano), *Monarda didyma* (bergamota), *Nepeta cataria* (gataria), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum vulgare* (orégano), *Orthosiphon aristatus* (ortosifão), *Petroselinum crispum* (salsinha), *Passiflora edulis* (maracujá), *Perilla frutescens* (perila), *Phillyrea latifolia* (aderno), *Rabdosia serra* (rabdósia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Rubus fruticosus* (amora silvestre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Satureja hortensis* (segurelha), *Symphytum officinalis* (confrei), *Thymus serpyllum* (tomilho selvagem), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Verbascum phlomoides* (Verbasco) (Figura 4) (PETERSON E SIMMONDS, 2003; KOMES et al., 2011; ROY; MUKHOPADHYAY, 2012; AYRANCI; ERKAN, 2013; SALTAS et al., 2013; STASSHENKO et al., 2013).

Figura 4 – Plantas que contem ácido rosmarínico.



Salvia officinalis



Mentha arvensis



Melissa officinalis



Rosmarinus officinalis

Legenda: Espécies de plantas que contem ácido rosmarínico.

A presença do ácido rosmarínico em plantas medicinais, ervas e temperos é responsável, pelo menos em parte, pelos efeitos benéficos destas plantas e também por suas importantes ações na promoção da saúde. O valor medicinal do ácido rosmarínico tem sido reconhecido por suas diferentes atividades biológicas, geralmente advindas das plantas de origem (BULGAKOV; INYUSHKINA; FEDOREYEV, 2012).

Uma importante característica do ácido rosmarínico é sua considerável capacidade antioxidante, a qual é em grande parte responsável pela sua ação neuroprotetora, por meio da atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio como os peroxinitritos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CHOI et al, 2002; QIAO et al., 2005). Além disso, devido a sua capacidade em diminuir a lesão celular induzida pelas espécies reativas de oxigênio, o ácido rosmarínico também possui atividade antiapoptótica, especialmente por aumentar o

potencial de membrana mitocondrial e inibir a atividade da caspase-3 (GAO et al., 2005). Lee e colaboradores (2008) demonstraram a capacidade protetora do ácido rosmarínico contra os efeitos do estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) utilizando uma linhagem de células dopaminérgicas humanas (SH-SY5Y). O ácido rosmarínico neste estudo foi capaz de impedir a morte dessas células (LEE et al., 2008).

Com a comprovação de que o ácido rosmarínico possui um importante efeito antioxidante, surge o interesse de verificar se o mesmo apresenta algum efeito neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio. Em estudos *in vivo*, utilizando modelos de doença de Alzheimer e de esclerose lateral amiotrófica em camundongos, foi demonstrado que o AR reduziu significativamente o déficit de memória associado à neurotoxicidade induzida pela proteína $A\beta_{25-35}$, retardando o início da doença e prolongando a expectativa de vida em camundongos transgênicos que expressam o gene SOD1 (cobre zinco superóxido dismutase) (ALKAM et al., 2007; SHIMOJO et al., 2010). Além disto, foi demonstrado que o AR possui importante ação anticolinesterásica em experimentos *in vitro*, sendo estes resultados importantes para explicar o efeito da melhora dos distúrbios de memória (DASTMALCHI et al., 2009). Por outro lado, foi também demonstrado que o AR apresenta efeito neuroprotetor no modelo *in vivo* de Doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em ratos. Nesse estudo, os autores demonstraram que o AR exerce importante efeito protetor dos neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA através da sua propriedade antioxidante e antiapoptótica indicando seu potencial no tratamento da Doença de Parkinson (REN et al., 2009; WANG et al., 2012).

O AR também apresenta efeito antibacteriano e antifúngico, sendo estes efeitos demonstrados em estudos *in vitro*, onde o AR foi capaz de inibir o crescimento da *Chlamydia pneumoniae*, bactéria responsável pela pneumonia atípica primária (SALIN, et al., 2011). Além disso, o extrato da planta *Kitaibelia vitifolia*, cujo componente majoritário é o AR, também possui atividade bactericida contra o *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Proteus mirabilis*, também apresentando efeito fungicida contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (MASKOVIC et al., 2011).

Efeitos antivirais do AR foram demonstrados por Swarup e colaboradores (2007) em um experimento onde camundongos foram infectados com o vírus da encefalite japonesa, um tipo de flavivírus.

Neste trabalho o AR reduziu significativamente a mortalidade dos animais e também a expressão de mediadores da inflamação como o TNF- α , IL-6 e IL-12. Outros estudos apontam para um efeito anti-HIV do AR devido sua habilidade de inibir a transcriptase reversa (HOOKER; LOTT; HARRICH, 2001; TEWTRAKUL et al, 2003). Além disso, foi comprovada a atividade anti-HIV de derivados nitro do AR. Neste estudo, realizado por Dubois e colaboradores (2008) foi avaliado a influência dos ácidos 6'-nitro e 6',6''-dinitrorosmarínico sobre a enzima HIV-1 integrase além do efeito inibitório dos mesmos na contaminação celular por HIV-1 em culturas de linfócitos MT-4 humanas. Ambos os derivados nitro do AR inibiram a enzima HIV-1 integrase e foram capazes de bloquear a replicação viral em células MT-4, sem causar toxicidade celular (DUBOIS et al., 2008).

O AR também apresenta importantes efeitos cardiovasculares. Um estudo sobre os efeitos do AR na formação da placa aterosclerótica em camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE) mostrou que essa substância pode reduzir as concentrações de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade, diminuindo a placa aterosclerótica na cavidade aórtica. Com isso, concluiu-se que o AR pode inibir a progressão da aterosclerose, o que provavelmente está relacionado às ações na regulação do metabolismo lipídico e na inibição da reação inflamatória que ocorre durante a progressão da aterosclerose (LI; TIAN; LIANG,2008).

O extrato do *Rosmarinus officinalis*, cujo principal composto é o AR, promoveu a diminuição da ativação de plasminogênio sérico do tipo 1 (PAI-1). As concentrações elevadas de PAI-1 estão associadas com a diminuição da fibrinólise endógena e um aumento do risco de eventos trombóticos e progressão da aterosclerose. Portanto, a diminuição da atividade do PAI-1 pelo AR poderia prevenir a aterosclerose e suas complicações (SINKOVIC et al., 2010). Outro estudo demonstrou que o extrato de manjeriço, cujo principal composto também é o AR, protegeu o miocárdio contra o infarto induzido pelo isoproterenol, e este efeito estaria relacionado com as propriedades antioxidantes do extrato (FATHIAZAD et al., 2012). E um estudo realizado com aorta isolada de ratos com diabetes induzida pela streptozocina, o AR administrado oralmente aos ratos diabéticos, protegeu suas aorta contra a lesão aórtica induzida pelo diabetes (SOTNIKOVA et al., 2013).

A ação do AR foi estudada na melanogênese em células de melanoma murino B16F10. O AR foi capaz de induzir a síntese de melanina pela ativação da proteína cinase A (PKA), e dessa forma, atuar

como preventivo contra o câncer de pele (LEE; KIM; PARK, 2007). Essa substância também apresentou ação estimulante da expressão da tirosinase *in vitro*, enzima chave da melanogênese, e capacidade de inibir o câncer de pele causado pela exposição à radiação UVA, podendo ser estudada como um possível agente fotoprotetor (SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009).

Muitos trabalhos tem demonstrado que o AR possui significativo efeito anti-inflamatório em diferentes modelos animais. As primeiras propriedades anti-inflamatórias do AR foram demonstradas por meio da sua capacidade de bloquear a fixação do complemento e inibir as lipooxigenases e ciclooxigenases (KIMURA; OKUDA; OKUDA, 1987; SAHU; RAWAL; PANGBURN, 1999; KELM; NAIR; STRASBURG, 2000). Segundo resultados publicados em 2005, o AR inibe a inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células dendríticas derivadas da medula óssea (PEREIRA et al., 2005). Além disso, apresenta um efeito anti-inflamatório observado através da diminuição da produção de óxido nítrico e também da diminuição da indução da sintase de óxido nítrico (NOS) induzidos por LPS em macrófagos (TICLI et al., 2005). O AR também reduz as concentrações de IL-4 e IL-5 em um modelo de alergia respiratória (COSTA et al, 2012, SANBONGI et al, 2004), e diminui a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em um modelo de lesão pulmonar induzida por LPS (CHU et al, 2012).

Além disso, o AR tem a habilidade de bloquear a fixação do complemento, atenuando a sinalização mediada pelo receptor da célula T (pela inibição das atividades de PLC- γ 1 e ITK), e suprimindo a via de sinalização IKK- β durante a regulação positiva de CCL11, um potente quimiotático e ativador de eosinófilos, basófilos e linfócitos T-helper (Th2) induzida por TNF- α (SAHU; RAWAL; PANGBURN, 1999; KANG; YUN; WON, 2003; LEE et al., 2006). No entanto, parece que boa parte do efeito anti-inflamatório observado em diferentes experimentos está relacionada à inativação do fator de transcrição NF- κ B induzida por TNF- α . Tem sido relatado que o AR inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B induzida por TNF- α em fibroblastos da derme humana (LEE et al., 2006) além de inibir a translocação de NF- κ B em células SH-SY5Y (FALLARINI et al., 2009).

O funcionamento normal do NF- κ B é importante para o equilíbrio entre vida e morte da célula (PAPA; GOMES; ROCKWELL, 2007). O TNF- α é um potente ativador do NF- κ B, que por sua vez é um potente indutor de TNF- α . Esta retroalimentação positiva é a chave para condições inflamatórias crônicas, tais como a artrite reumatóide. A terapia padrão para essas condições inclui os bloqueadores de NF- κ B,

tais como o ácido acetilsalicílico e os glicocorticóides. Entretanto, estes fármacos possuem efeitos adversos consideráveis que limitam seu uso em humanos. O AR, sendo um regulador não tóxico da ativação do NF- κ B induzida pelo TNF- α , parece ser uma substância promissora no tratamento de doenças envolvendo a inflamação (PAPA; GOMES; ROCKWELL, 2007).

Porém, apesar de ser uma molécula bastante estudada, poucos trabalhos como o trabalho de Lucarini e colaboradores (2013) demonstram o efeito antinociceptivo do AR e os mecanismos pelo qual ela exerce este efeito ainda não foram elucidados. A tabela 1 resume algumas das principais atividades farmacológicas para o AR.

Tabela 1 – Efeitos farmacológicos do AR.

Efeitos	Mecanismos de ação	Referências
Antioxidante e antiapoptótico	Sequestrador de peroxinitrito e peróxido de hidrogênio	CHOI et al, 2002
	Inibe a produção de NO e da forma induzida da iNOS induzidas por LPS em macrófagos RAW264.7	QIAO et al., 2005
	Inibe a atividade da caspase-3 e diminui a quantidade de ROS na apoptose induzida por H ₂ O ₂ em astrócitos	GAO et al., 2005
Antiapoptose e Antiamnésico	Diminui a quantidade de ROS, suprime Bcl-2, estimula a enzima heme oxigenasse-1 (HO-1) na apoptose induzida por H ₂ O ₂ em células SH-SY5Y	LEE et al., 2008
	Diminui a toxicidade induzida por 6-OHDA no modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA em camundongos	REN et al., 2009 WANG et al., 2012
	Previne a redução de memória pela injeção i.c.v. de A β ₂₅₋₃₅ por prevenir a nitrização (nitration) das proteínas	ALKAM et al., 2007; SHIMOJO et al., 2010
Bactericida	Inibe o crescimento bacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Chlamydia pneumoniae</i>) in vitro	SALIN, et al., 2011 MASKOVIC et al., 2011
Antiviral	Derivados do AR inibem a contaminação de linfócitos humanos MT-4 por HIV-1 e a HIV-1 integrase	DUBOIS et al., 2008

Cardiovasculares	Reduz as concentrações de lipídios sanguíneos e controla o tamanho da placa aterosclerótica na aorta em camundongos os com deficiência de apoE	LI,; TIAN; LIANG,2008
	diminui a atividade do inibidor da ativação de plasminogênio sérico do tipo 1 (PAI-1)	SINKOVIC et al., 2010
	Protege o miocárdio contra o infarto induzido por isoproterenol em ratos	FATHIAZAD et al., 2012
Fotoprotetor	Estimula a expressão da tirosinase in vitro no modelo de melanogênese em células de melanoma murino B16	SANCHEZ-CAMPILLO et al., 2009
Anti-inflamatório	Reduz as concentrações de IL-4 e IL-5 no modelo de alergia respiratória por partículas de diesel em camundongos	COSTA et al, 2012
	Diminui a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β nas lesões pulmonares induzidas por LPS em camundongos	CHU et al, 2012
	Bloqueia a fixação do complemento, atenuando a sinalização mediada pelo receptor da célula T (pela inibição das atividades de PLC- γ 1 e ITK), e suprime a via de sinalização IKK- β durante a upregulation de CCL11.	SAHU; RAWAL; PANGBURN,1999 KANG; YUN; WON, 2003 LEE et al., 2006
	Reduz a mortalidade e reduz os mediadores da inflamação TNF- α , IL-6 e IL-12 no modelo de encefalite japonesa induzida por bactéria em camundongos.	SWARUP et al., 2007

Legenda: Principais efeitos farmacológicos do AR.

Segundo dados da organização mundial da saúde (OMS), estima-se que cerca de 20% da população mundial adulta sofra de algum tipo de dor crônica (DOBKIN; BOOTHROYD, 2008). Em muitos casos, a falta de tratamento adequado ou a inexistência de um tratamento realmente efetivo acaba levando a disfunções e até mesmo incapacidade transitória ou permanente, afetando substancialmente a qualidade de vida e a capacidade produtiva desses pacientes. Neste sentido, a contínua busca por novas estratégias terapêuticas que sejam eficazes e seguras, tem revelado alternativas bastante promissoras no controle da dor, relacionadas, por exemplo, ao exercício físico, terapia manual e

acupuntura. No entanto, os medicamentos continuam a ser a principal ferramenta para o tratamento e controle dos estados dolorosos, e as plantas medicinais representam uma inesgotável fonte de substâncias para a pesquisa de produtos com potencial efeito analgésico.

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por um longo período de tempo, minerais, produtos animais e plantas foram as principais fontes de moléculas biologicamente ativas (PHILLPSON, 2001). Os compostos derivados de plantas possuem uma grande diversidade molecular e podem ser utilizados como modelo para a síntese de compostos mais ativos e/ou seletivos para o tratamento de determinada doença. Apesar dos avanços da química e química farmacêutica, muitas substâncias ativas derivadas de plantas têm síntese complexa e muitas vezes com baixos rendimentos, o que torna a produção industrial inviável economicamente (FRANÇA et al., 2001).

Nos últimos anos, há um crescente interesse no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, para os mais diversos fins incluindo o tratamento da dor e das doenças inflamatórias. Isso se deve a crise econômica, o alto custo dos medicamentos industrializados, a ineficiência da medicina convencional no tratamento de algumas doenças, uso abusivo e/ou incorreto de fármacos sintéticos podendo gerar sérios efeitos colaterais e ainda o difícil acesso da população à assistência médica (RATES, 2001).

Algumas espécies das famílias Lamiaceae e Boraginaceae apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória já descritas na literatura, sendo que plantas deste gênero são características por produzirem uma ampla variedade de polifenóis, como o AR, com propriedades farmacológicas já bem descritas. Aliado a isso, estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que a *Melissa officinalis*, cujo princípio ativo majoritário é o AR, apresentou efeito antinociceptivo em diferentes modelos animais. Além disto, o próprio AR apresentou efeito antinociceptivo no modelo da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (GUGINSKI et al., 2009).

Somadas essas observações, e aliadas ao fato de que o AR apresenta efeito anti-inflamatório já demonstrado em alguns modelos animais, este trabalho propôs investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório desta substância, bem como, explorar alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nestas atividades.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do AR e seus possíveis mecanismos de ação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito antinociceptivo do AR em modelos de nocicepção aguda em camundongos.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do AR em modelos de nocicepção crônica em camundongos.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do AR no modelo de peritonite induzida pela carragenina.
- Avaliar o envolvimento do sistema glutamatérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e opióide no efeito antinociceptivo do AR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FÁRMACOS E REAGENTES

As substâncias utilizadas, sua origem e eventuais características são listadas a seguir: ácido rosmarínico, adjuvante completo de Freund, carragenina, cainato, ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico, n-metil-D-aspartato, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, alfa-metil-para-tirosina e paraclorofenilalanina (Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos); ácido acético e formalina (Merck, Darmstadt, Germany); sulfato de morfina solução injetável (União Química, MG, Brasil); cloridrato de naloxona solução injetável (Cristália, SP, Brasil); cloridrato de cetamina solução injetável e cloridrato de xilazina solução injetável (Syntec, SP, Brasil); dexametasona (Aché, SP, Brasil); isoflurano (Cristália, SP, Brasil; kits da R&D Systems (Minneapolis, MN) de ensaio imunoenzimático (ELISA) de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) para camundongos.

O AR, com teor de pureza de 98%, obtido da Sigma Aldrich (USA), foi diluído em solução salina (0,9%) com 5% de TWEEN 80, sendo então o veículo. A concentração final de tween 80 não ultrapassou 5%, e não causou nenhum efeito *per se*.

3.2 ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos de aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina sob registro PP00475.

Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos em biotério próprio, em micro-isoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12h, com água e comida à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Por outro lado, é importante salientar que o número de animais utilizados e os estímulos empregados

foram os mínimos necessários para demonstrar estatisticamente os efeitos dos tratamentos.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

3.3.1 Contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

A injeção intraperitoneal de ácido acético é descrita como um modelo para avaliar a nocicepção visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade, podendo ser considerada uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os animais foram tratados pela via intragástrica (i.g.) com veículo (tween 80 5% em salina, 10 ml/kg) ou AR (1-10 mg/kg), dose escolhida, assim como em todos os experimentos deste estudo, com base em estudo prévio no nosso laboratório (GUGINSKI et al., 2009) e adaptada a intensidade do estímulo nociceptivo. Após o tratamento, os animais foram individualmente ambientados em funis de vidro transparentes. Decorridos 60 min do tratamento, os animais receberam uma injeção i.p. de 450 µl de ácido acético (0,6%). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados em funis de vidros individuais, e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A dose capaz de produzir 50% da inibição máxima (DI₅₀) foi calculada. As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1999 a; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

3.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica, decorrente da estimulação direta das fibras nociceptivas e a de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR et al., 1987, TJØLSEN et al., 1992). O teste de nocicepção induzida pela formalina foi executado conforme metodologia descrita por Figueiredo e

colaboradores (2011), e consiste na injeção de 20 μ L de uma solução de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. Após aplicação, os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e observados com relação ao tempo de resposta nociceptiva durante as duas fases do modelo. O indicativo de nocicepção foi o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada, durante os primeiros cinco minutos após a injeção (primeira fase ou fase neurogênica), e durante o intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase ou fase inflamatória). Os animais foram tratados pela via i.g. com veículo (10 ml/kg) ou AR (3-30 mg/kg) 60 minutos antes da injeção ipl. de formalina.

3.3.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Uma vez que o sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo, tanto em nível periférico quanto central (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; JESSE; SAVEGNAGO; NOGUEIRA, 2008), verificou-se o efeito do tratamento com o AR administrado por via intragástrica (i.g.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por Meotti e colaboradores(2006). Os animais foram tratados intragastricamente com veículo (10 ml/kg) ou AR (0,3-3 mg/kg). Após 60 minutos da administração dos tratamentos com o AR ou veículo, os animais foram injetados intraplantarmente (20 μ L) com solução de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 em NaOH) na pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO CRÔNICA

3.4.1 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático (LNPC)

O modelo experimental de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático mimetiza sintomas importantes observados em pacientes com neuropatia periférica e é muito empregado na pesquisa comportamental (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Uma incisão lateral na perna direita foi realizada para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG e BASBAUM, 1998). A ligadura de aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi realizada com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) que também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond).

Os camundongos operados receberam veículo (10 ml/kg) ou AR (1-10 mg/kg) pela via ig. 7 dias após a cirurgia. O grupo falso operado (FO) (teve o procedimento cirúrgico sem a constrição) recebeu veículo (10 ml/kg). A hiperalgesia mecânica foi avaliada imediatamente antes (0 h) e depois (1, 2 e 4 horas) do tratamento para avaliar o efeito temporal do AR. Para investigar os efeitos do tratamento prolongado, o AR foi administrado 2 x ao dia (a cada 12 h) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada 2 h após o primeiro tratamento do dia. O tratamento repetido foi administrado do 7º ao 11º dia depois da ligadura, sendo interrompido por 2 dias. O tratamento foi reiniciado por mais dois dias para avaliar o desenvolvimento de uma possível tolerância ao AR.

A hiperalgesia mecânica foi avaliada segundo Bortolanza e colaboradores (2002), onde a frequência de retirada da pata a 10 aplicações dos filamentos de von Frey (0,4 g) sob a região plantar da pata que teve a constrição foi expressa como porcentagem. A frequência de retirada foi determinada antes e depois da constrição.

3.4.2 Nociceção inflamatória crônica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)

O adjuvante completo de Freund injetado na pata traseira é um dos agentes mais comumente utilizados para mimetizar uma inflamação de longa duração com dano tecidual (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Os camundongos foram tratados com 20µl de CFA (Adjuvante completo de Freund, 1 mg/ml de *Mycobacterium Tuberculosis* em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato manida) subcutaneamente na superfície plantar da pata posterior direita. Vinte e quatro horas após, os camundongos foram tratados intragastricamente com veículo (10 ml/kg) ou AR (1-10 mg/kg). O grupo que não recebeu CFA (falso-tratamento) recebeu salina, (0,1 ml/10 g, i.pl.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada imediatamente antes (0 h) e depois (1, 2 e 4 h) do tratamento para avaliar o efeito temporal do AR. Para investigar os efeitos do tratamento prolongado, o AR foi administrado 2 x ao dia (a cada 12 h) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada 1 h após o primeiro tratamento do dia. O tratamento repetido foi administrado do 7º ao 11º dia depois da ligadura, sendo interrompido por 2 dias. O tratamento foi reiniciado por mais dois dias para avaliar o desenvolvimento de uma possível tolerância ao AR.

A hiperalgesia mecânica foi avaliada segundo Bortolanza e colaboradores (2002) de acordo com o descrito no item 4.3.1.

3.4.3 Dor crônica induzida pelo modelo da síndrome da dor complexa regional (SDCR)

Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo da SDCR tipo I em ratos, e chamaram-no de dor pós-isquemia crônica (DPIC). O método consiste na colocação de um torniquete no tornozelo do animal. Para isto o rato é anestesiado e um anel de borracha é colocado proximal a articulação do tornozelo, reduzindo o seu fluxo sanguíneo por três horas. Posteriormente o mesmo é removido para permitir a reperfusão. Dois dias após a reperfusão, o animal apresenta dor inflamatória e, no sétimo dia, dor neuropática. Este modelo foi adaptado para camundongos em nosso laboratório e o modo como se procede em camundongos segue abaixo.

Para realização da isquemia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg) (QUINTÃO et al., 2006). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas

interdigitais), posicionou-se um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden) proximal a articulação do tornozelo direito de modo a fazer um torniquete. O animal foi mantido sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial por três horas e então o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Após a isquemia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, voltando posteriormente para o biotério do laboratório.

Com o objetivo de avaliar tanto a dor inflamatória quanto a dor neuropática gerada pela isquemia/reperfusão, os animais foram avaliados em dois procedimentos diferentes:

- Procedimento 1: Os camundongos receberam veículo (10 ml/kg) ou AR (1-10 mg/kg) pela via i.g. 2 dias após o procedimento de isquemia/reperfusão. O grupo falso operado (não teve o procedimento de isquemia/reperfusão) recebeu veículo (10 ml/kg). A hiperalgesia mecânica foi avaliada imediatamente antes (0 h) e depois (1, 2 e 4 h) do tratamento para avaliar o efeito temporal do AR. Para investigar os efeitos do tratamento prolongado, o AR foi administrado 2 x ao dia (a cada 12 h) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada 1 h após o primeiro tratamento do dia. O tratamento repetido foi administrado do 2º ao 6º dia depois da ligadura, sendo interrompido por 2 dias. O tratamento foi reiniciado por mais dois dias para avaliar o desenvolvimento de uma possível tolerância ao AR.

- Procedimento 2: idêntico ao procedimento 1, porém, iniciando 7 dias após a isquemia/reperfusão. A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando os filamentos de Von Frey segundo BORTOLANZA et al. (2002) de acordo com o descrito no item 4.3.1

3.5 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

3.5.1 Avaliação da participação do sistema glutamatérgico

Com o objetivo de evidenciar mais diretamente a participação do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do AR em nível central, agonistas de receptores para aminoácidos excitatórios (AAEs) foram administrados intratecalmente. O procedimento utilizado para a injeção it. foi similar ao descrito previamente por Hylden e Wilcox (1980). Após tricotomia da pele, os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 25 µl foi inserida através da pele no espaço subdural entre as vértebras espinais

L5-L6. A resposta nociceptiva foi definida como o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen) após administração i.t. (5 μ l) de N-metil-D-aspartato (NMDA, agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio); ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico(trans-ACPD, agonista não-seletivo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 10 nmol/sítio); ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA, agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio) e cainato (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo cainato, 110 pmol/sítio) (SCHEIDT et al., 2002; GADOTTI et al., 2006). O tempo que o animal lambeu/mordeu a região posterior foi cronometrado dentro do tempo padronizado para cada agonista (NMDA: 5 min, AMPA: 1 min, cainato: 4 min e trans-ACPD: 15 min, após sua administração) e considerado como índice de nocicepção. Os animais receberam pela via i.g. veículo (10 ml/kg) ou AR, na dose que apresentou efeito no modelo de nocicepção induzida por glutamato intraplantar, 3 mg/kg, 60 min antes da injeção i.t. dos agonista glutamatérgicos.

3.5.2 Avaliação da participação das citocinas pró-inflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , também estão envolvidos na modulação de processos nociceptivos, e a capacidade das citocinas induzirem nocicepção quando administradas por via i.t. tem sido atribuída à indução da liberação de glutamato e SP dos terminais nervosos (TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Por esta razão, foi investigado o efeito do AR na resposta nociceptiva induzida pelo TNF- α e pela IL-1 β em camundongos. O procedimento para a administração i.t. de TNF- α (0,1 pg/sítio) e IL-1 β (1 pg/sítio) foi semelhante ao descrito anteriormente e o tempo de resposta nociceptiva foi cronometrado dentro do tempo padronizado das citocinas, 15 min (CHOI et al., 2003; MEOTTI et al., 2007). Os animais foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.g.) ou AR (3 mg/kg, i.g.) 60 min antes da injeção i.t. das citocinas. Após os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen) foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção.

3.5.3 Avaliação do envolvimento do Sistema Opióide

Para avaliar se o sistema opióide poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo do AR, utilizou-se a metodologia descrita por SANTOS e colaboradores (1999). Os animais foram tratados previamente com naloxona (1 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 20 minutos antes da administração de veículo (10 ml/kg, i.g.), AR(3 mg/kg, i.g.) ou do controle positivo morfina (2,5 mg/kg, s.c.), e a resposta nociceptiva foi verificada após a injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 com NaOH) na pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção.

3.5.4 Avaliação do envolvimento do Sistema Serotoninérgico

Para investigar o envolvimento da produção de 5-HT endógena no efeito antinociceptivo do AR, camundongos foram tratados previamente com p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de 5-HT) ou com veículo, uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. Após 20 min decorridos da última administração de PCPA, os animais receberam AR(3 mg/kg, i.g.)ou veículo (10 ml/kg, i.g.),e a resposta nociceptiva foi verificada após a injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 com NaOH) na pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção.

3.5.5 Avaliação do envolvimento do Sistema Noradrenérgico

Para investigar o envolvimento da produção de noradrenalina endógena no efeito antinociceptivo do AR, camundongos foram tratados previamente com alfa-metil-p-tirosina (AMPT, 100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de noradrenalina) ou com veículo, 4 horas antes do tratamento com AR(3 mg/kg, i.g.)ou veículo (10 ml/kg, i.g.),e a resposta nociceptiva foi verificada após a injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 com NaOH) na pata

traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nocicepção.

3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

3.6.1 Peritonite induzida por carragenina

A carragenina foi utilizada como estímulo para produzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal dos camundongos, com um grande número de leucócitos no exsudato. Os animais foram tratados previamente com veículo (10 ml/kg, i.g.), glicocorticoide dexametasona (anti-inflamatório esteroidal usado como controle positivo, 0,5 mg/kg, i.p.) ou AR (1-10 mg/kg, i.g.) 60 min antes da injeção de 0,5 ml de carragenina (750 microgramas/cavidade) na cavidade peritoneal. O grupo salina recebeu somente uma injeção de 0,5 ml de salina (10 ml/kg) no peritônio.

Quatro horas após a indução da peritonite, os animais foram mortos por inalação de CO₂ e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de solução salina heparinizada (20 UI/ml). A seguir, o líquido peritoneal foi coletado e processado para posterior análise da celularidade, determinação das concentrações de citocinas e da atividade da mieloperoxidase (PAGANO et al., 2002).

3.6.1.1 Contagem dos leucócitos peritoneais

A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer após a diluição do fluido peritoneal com líquido de Türk (1:20). Além disso, utilizando um microscópio ótico, foi feita a contagem diferencial de leucócitos no fluido peritoneal que foi posteriormente confirmado pela contagem das alíquotas destas células que foram centrifugadas em uma citocentrífuga Cytospin (Tharmac, Germany) e corado com May-Grünwald Giemsa (MONTANHER et al., 2007).

3.6.1.2 Determinação das concentrações de citocinas

Quatro horas após a peritonite induzida pela carragenina, amostras (100 μ l) do fluido intraperitoneal foram coletadas e imediatamente preparadas para a análise das citocinas. Kits de ensaio imuno absorventes ligados a enzimas (ELISA), comercialmente disponíveis, foram utilizados. As concentrações das citocinas, TNF- α (kit DY410, sensi de 31.25-2000 pg), IL-1 β (kit DY401, sensi de 15.62-1000 pg) e IL-10 (kit DY417, sensi de 31.25-2000 pg) foram mensurados de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas foram estimados por interpolação de uma curva padrão obtida por medidas colorimétricas em 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) usando um leitor de placa de ELISA (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha). Todos os resultados foram expressos em pg/ml.

3.6.1.3 Quantificação da mieloperoxidase (MPO)

Amostras do exudato peritoneal (100 μ l) foram coletadas e imediatamente preparadas para a análise da atividade da MPO. Os exudatos foram centrifugados a 10,000 x g por 30 min a 4°C. Uma alíquota então foi usada para reação com solução de 1.6 mM de tetrametilbenzidina HCl em dimetilformamida e 0.1 mM de peróxido de hidrogênio em placas de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 3 min, e então a reação foi cessada pela adição de acetato de sódio (1.46 M, pH 3.0). A atividade da MPO foi estimada pela média das medidas colorimétricas usando o leitor de placa (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha) em uma absorbância de 650 nm. Os dados foram expressos como DO/ml.

3.6.1.4 Extravasamento Celular

No início do experimento, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (1-2%), e uma solução de azul de Evans (25 mg/kg) foi injetada intravenosamente para ser o marcador de permeabilidade capilar. Uma amostra do líquido intraperitoneal (500 μ l) foi coletada, separada e estocada a -20°C para determinar a concentração de azul de Evans. A quantidade de azul de Evans extravasado foi estimada por medidas colorimétricas usando uma placa de leitura (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, KG, Germany) em uma absorbância de 620 nm. Os dados foram expressos em termos de concentração do

azul de Evans ($\mu\text{g/ml}$) que extravazou para a cavidade peritoneal por interpolação de uma curva padrão de azul de Evans na faixa de 5-100 $\mu\text{g/ml}$.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA

Para excluir a possibilidade de prejuízo no desempenho motor dos animais após o tratamento com o AR, foi avaliada a atividade locomotora espontânea no campo aberto. A atividade locomotora foi avaliada em um campo aberto, que consiste de uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm e o fundo desta arena foi dividido em 12 quadrados idênticos (MEOTTI et al., 2006).

Os camundongos foram tratados com veículo (10 ml/kg, i.g.) ou AR (1-10 mg/kg, i.g.) 60 min antes de serem colocados individualmente na arena e observados por um período de 6 min. O número de quadrados cruzados com todas as patas foi contado.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os dados de nocicepção crônica, bem como os mecanismos opióide foram analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni. Os valores de DI_{50} (dose capaz de inibir 50% do efeito máximo) foram determinados por regressão não-linear e reportados como a média geométrica com intervalo de confiança de 95%. Demais resultados foram analisados por meio do teste t de Student. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

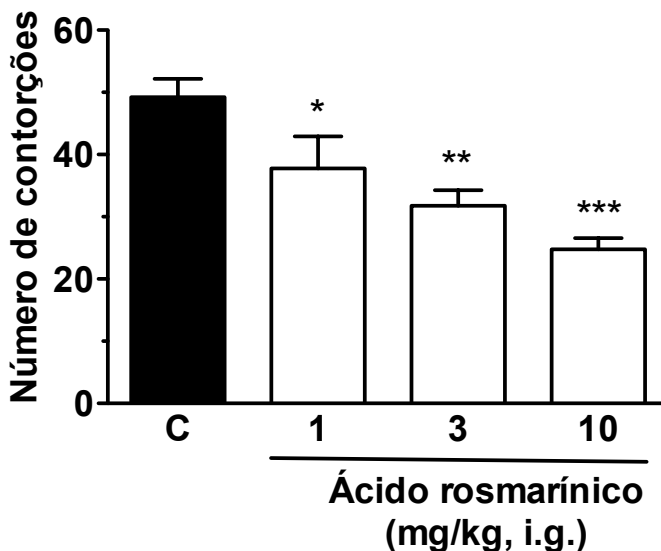
4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

4.1.1 Contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

Os dados apresentados na figura 5 mostram que a administração intragástrica do AR (1 – 10mg/kg) causou inibição dependente da dose do número de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos quando comparado com o grupo controle. A DI_{50} estimada foi de 10 mg/kg e a inibição de $50 \pm 4\%$.

Figura 5 – Efeito do AR administrado pela via i.g. na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.

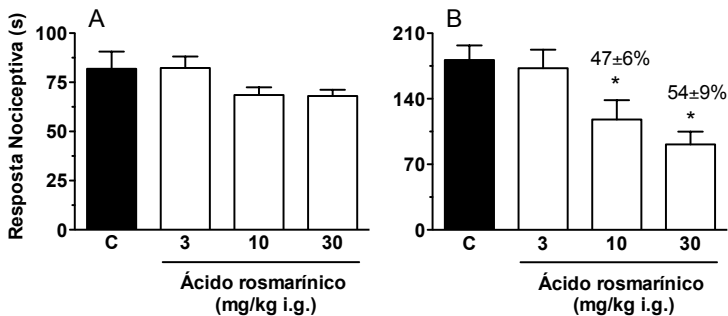


Legenda: Cada coluna representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo controle (C)(salina+5% tween 80) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

4.1.2 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

O teste da formalina foi utilizado em conjunto com o teste das contorções induzidas pelo ácido acético, para a avaliação inicial do possível efeito antinociceptivo do AR. Conforme demonstrado na figura 6, o AR, nas doses de 10 e 30 mg/kg, foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo dos animais na segunda fase (fase inflamatória) do teste da formalina (Figura 6), com uma inibição de $54 \pm 9\%$ nos animais tratados com a dose de 30 mg/kg quando comparado com o grupo controle.

Figura 6 - Efeito do AR na nociceção induzida pela formalina em camundongos.



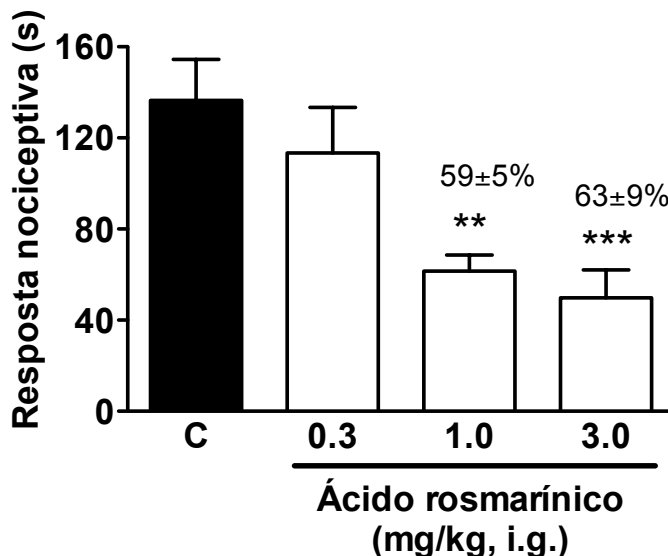
Legenda: Efeito antinociceptivo do AR (3-30mg/kg) administrado pela via oral em relação à nociceção neurogênica (A) e inflamatória (B), induzida pela injeção i.pl. de formalina (2,5%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$ comparados com o grupo controle (C)(salina+5% tween 80) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

4.1.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Os resultados apresentados na figura 7 demonstram que o AR (1 e 3 mg/kg), quando administrado pela via i.g., causou uma inibição significativa e dependente da dose na nociceção induzida pela injeção

i.pl. de glutamato, com uma DI_{50} de 1,1 (0,6-1,8) mg/kg e uma inibição de $63 \pm 9\%$ quando comparado com o grupo controle.

Figura 7 - Efeito do AR na nociceção induzida pelo glutamato em camundongos.



Legenda: Efeito antinociceptivo do AR (0,3-3,0mg/kg) administrada pela via i.g. em relação à nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo Controle (C)(salina+5% tween 80) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

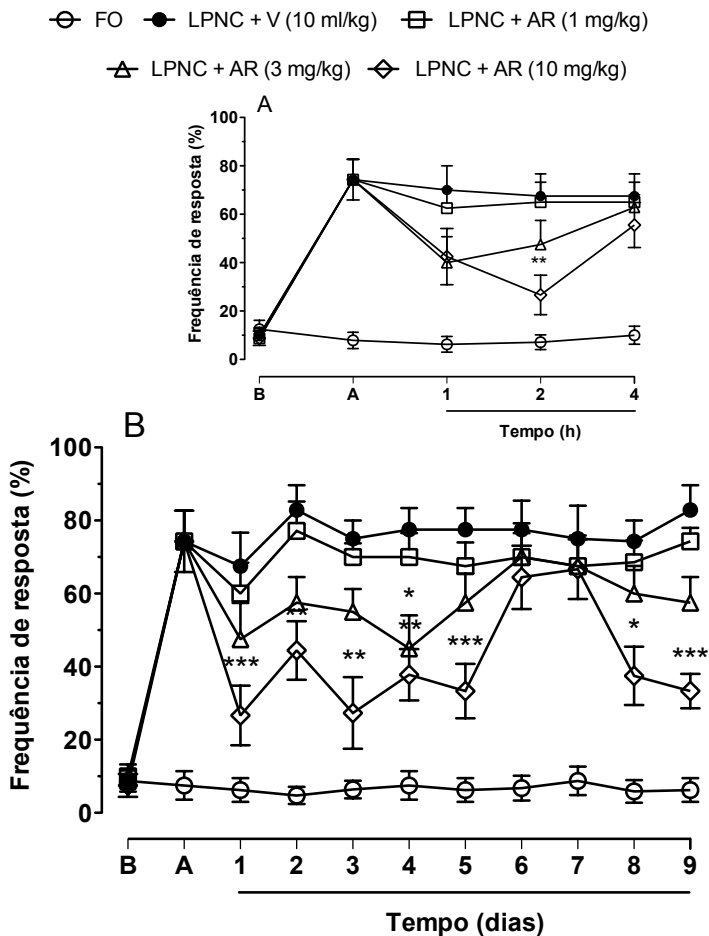
4.2 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE NOCICEÇÃO CRÔNICA

4.2.1 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor neuropática induzida pela constrição parcial do nervo ciático

A ligação parcial do nervo ciático causou um importante desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata traseira ipsilateral, 7 dias após o procedimento cirúrgico comparado com o grupo falso

operado (FO). O tratamento agudo com o AR pela via i.g. (1-10 mg/kg) diminuiu significativamente as respostas de retirada da pata, com inibição de $46 \pm 14\%$ após 2 h do tratamento na dose de 10 mg/kg (Figura 8A). O tratamento diário como AR (1, 3 e 10 mg/kg, i.g.), duas vezes ao dia, por cinco dias consecutivos, causou diminuição significativa da hiperalgesia mecânica dos camundongos, as inibições máximas observadas em cada dia de tratamento ficaram entre $39 \pm 8\%$ e $54 \pm 5\%$. Após a suspensão do tratamento, o efeito anti-hiperalgésico do AR não foi observado. Quando o tratamento foi restabelecido no oitavo e no nono dia, a administração de AR (1-10 mg/kg, i.g.) produziu o mesmo efeito anti-hiperalgésico ($60 \pm 6\%$ de inibição na dose de 10 mg/kg, i.g.), mostrando que o AR não induziu tolerância neste modelo (Figura 8B).

Figura 8 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica no modelo da LNPC.



Legenda: Efeitos da administração aguda (painel A) e crônica (painel B) do AR (1-10 mg/kg) administrado pela via i.g. na hiperalgesia mecânica (dor neuropática) induzida pela constrição parcial do nevo ciático em camundongos. No ponto B estão representados os animais antes da cirurgia. No ponto A estão representados os animais 7 dias após a cirurgia. No sexto e no sétimo dia os animais não foram tratados com AR. Cada grupo representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo controle (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

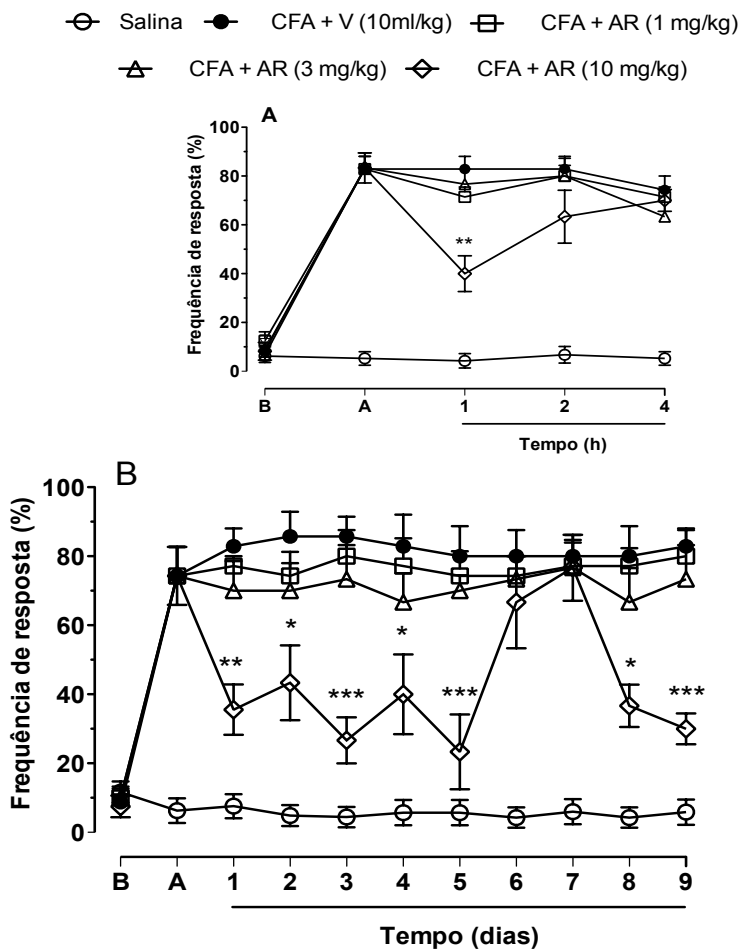
4.2.2 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor inflamatória induzida pelo CFA

A injeção de CFA na pata é um modelo de dor inflamatória que aumenta o limiar de hiperalgesia mecânica em resposta a aplicação do filamento de von Frey (0.4 g), quando comparado ao grupo falso-tratado (Figura 9, A e B). Os resultados observados na figura 9A demonstram que o AR (1-10 mg/kg i.g.) produziu, de forma aguda, uma inibição significativa da hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA na pata direita, com inibição máxima de $39 \pm 12\%$. Quando o AR (1-10 mg/kg i.g.) foi administrado cronicamente (duas vezes ao dia de 12 em 12 horas) por 5 dias, ele também reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA (Figura 9B). Este efeito foi evidente até o quinto dia de tratamento (inibições entre $39 \pm 12\%$ e $87 \pm 11\%$). Quando o tratamento foi interrompido por dois dias, a hiperalgesia mecânica foi reestabelecida. E quando o tratamento foi reiniciado no oitavo dia, o AR mais uma vez reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica.

4.2.3 Efeito do ácido rosmarínico sobre a dor inflamatória e neuropática induzida no modelo de dor pós isquemia crônica (DPIC)

O DPIC, um modelo animal da síndrome da dor complexa regional do tipo I, aumentou o limiar basal de hiperalgesia mecânica em resposta a aplicação dos filamentos de von Frey (0.4 g), comparado ao grupo que não sofreu o procedimento (SP) (Fig 10, A e B; Fig 11, A e B). O AR (1-10 mg/kg i.g.) reduziu a resposta de hiperalgesia mecânica produzida pelo DPIC no teste feito 2 dias após o procedimento (dor neurogênica), com inibição de $82 \pm 14\%$ duas horas após o tratamento (Figura 10A), bem como, no teste feito 7 dias após o procedimento (dor inflamatória), com inibição de $66 \pm 84\%$ uma hora após o tratamento e uma inibição de $42 \pm 3\%$ duas horas após o tratamento (Figura 11A). Quando administrado cronicamente (12/12 h) por 5 dias, o AR (1-10 mg/kg i.g.) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica provocada pelo DPIC tanto nos testes feitos 2 dias após o procedimento (inibição de $39 \pm 8\%$ a $86 \pm 14\%$), quanto nos testes feitos 7 dias após o procedimento (inibição de $44 \pm 3\%$ a $74 \pm 3\%$), e a suspensão do tratamento por dois dias não afetou sua eficácia nos dias subsequentes (Figuras 10 e 11B).

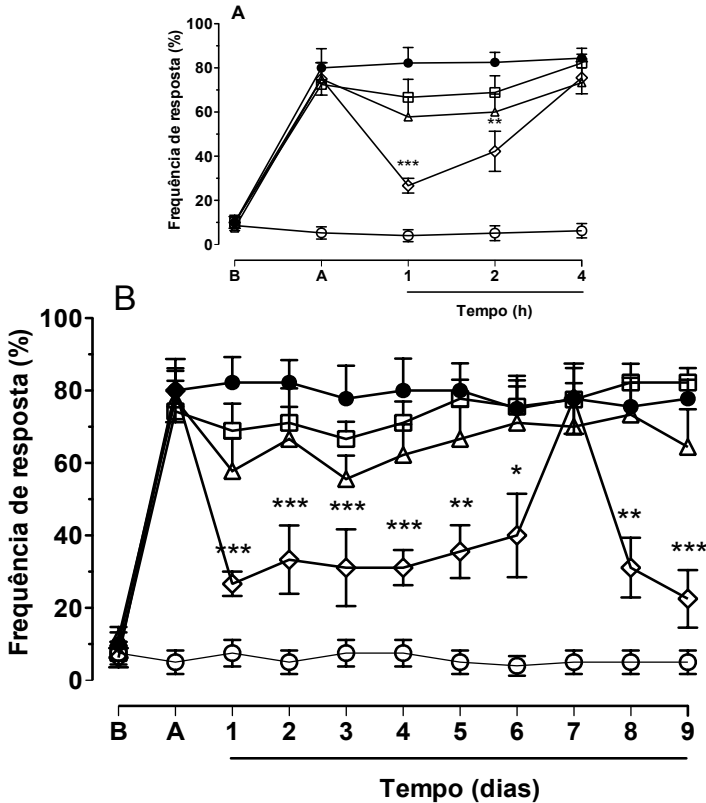
Figura 9 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA.



Legenda: Efeitos da administração aguda (painel A) e crônica (painel B) do AR (AR) (1-10 mg/kg) administrada pela via i.g. na hiperalgesia mecânica (dor inflamatória) induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos. No ponto B estão representados os animais antes do CFA. No ponto A estão representados os animais 7 dias após o CFA. No sexto e no sétimo dia os animais não foram tratados com AR. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo controle (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

Figura 10– Efeito do AR na hiperalgesia mecânica inflamatória no modelo da DPIC.

○ SP ● DPIC + V (10ml/kg) □ DPIC + AR (1 mg/kg)
 ▲ DPIC + AR (3 mg/kg) ◇ DPIC + AR (10 mg/kg)

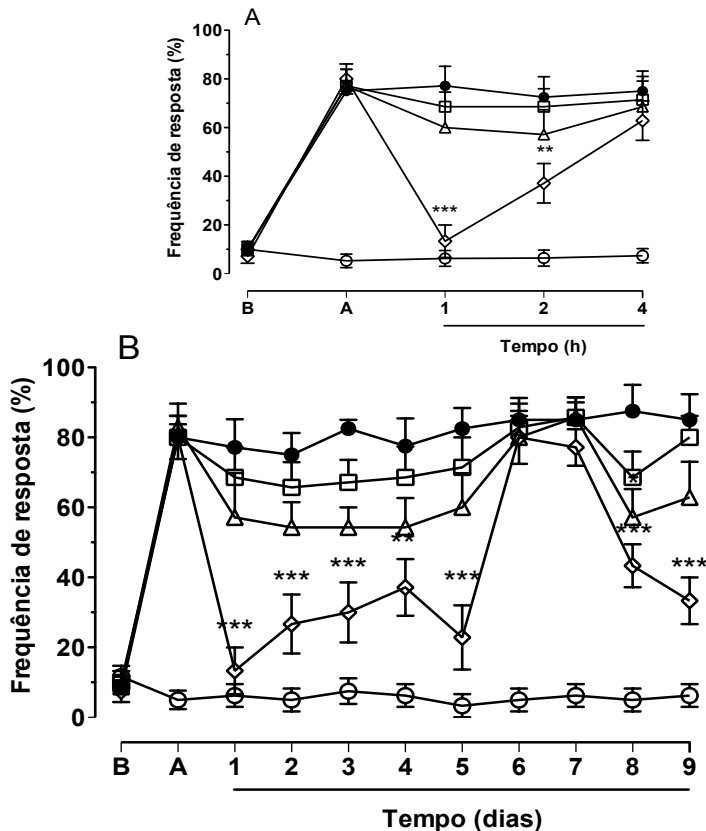


Legenda: Efeitos da administração aguda (painel A) e crônica (painel B) do AR (AR) (1-10 mg/kg) administrada pela via i.g. na hiperalgesia mecânica (dor inflamatória) induzida pelo DPIC em camundongos. No ponto B estão representados os animais antes da isquemia (DPIC). No ponto A estão representados os animais 7 dias após a isquemia (DPIC). No sexto e no sétimo dia os animais não foram tratados com AR. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo controle (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

Figura 11 – Efeito do AR na hiperalgesia mecânica neuropática no modelo da DPIC.

○ SP ● DPIC + V (10ml/kg) ◻ DPIC + AR (1 mg/kg)

▲ DPIC + AR (3 mg/kg) ◇ DPIC + AR (10 mg/kg)



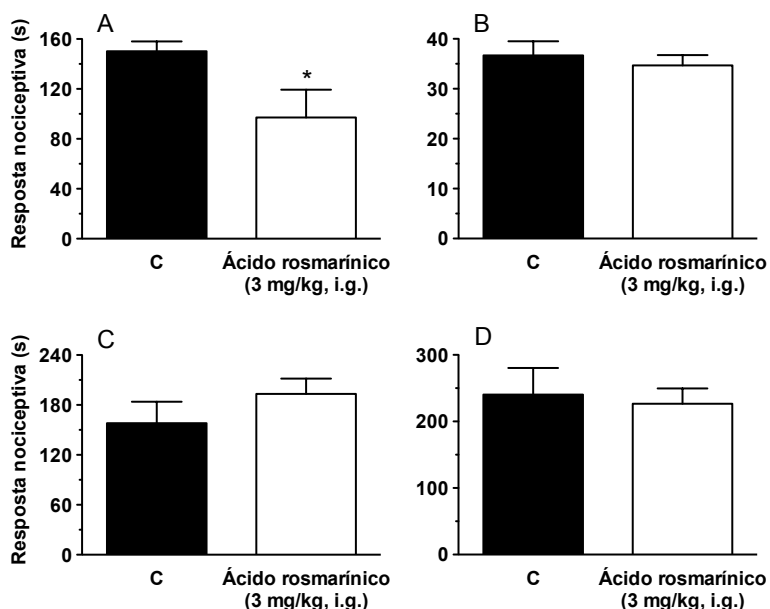
Legenda: Efeitos da administração aguda (A) e crônica (B) do AR (AR) (1-10 mg/kg) administrada pela via i.g. na hiperalgesia mecânica (dor neuropática) induzida no modelo da DPIC. No ponto B estão representados os animais da DPIC. No ponto A estão representados os animais 2 dias após a isquemia (DPIC). No sexto e no sétimo dia os animais não foram tratados com AR. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam os E.P.M.. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados com o grupo controle (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

4.3 AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO

4.3.1 Efeito do ácido rosmarínico na nocicepção induzida por agonistas glutamatérgicos.

Para avaliar a atividade antinociceptiva do AR sobre a nocicepção induzida pela ativação de receptores glutamatérgicos, agonistas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (trans-ACPD) foram injetados intratecalmente e o comportamento nociceptivo foi observado. Constatou-se na figura 12 que, o AR (AR) (3,0mg/kg), administrado pela via i.g, reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pelo NMDA (Figura 14A) com inibição de $35 \pm 15\%$, porém, não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo AMPA (Figura 14B), cainato (Figura 14C) e trans-ACPD (Figura 14D).

Figura 12 – Efeito do AR sobre o sistema glutamatérgico.

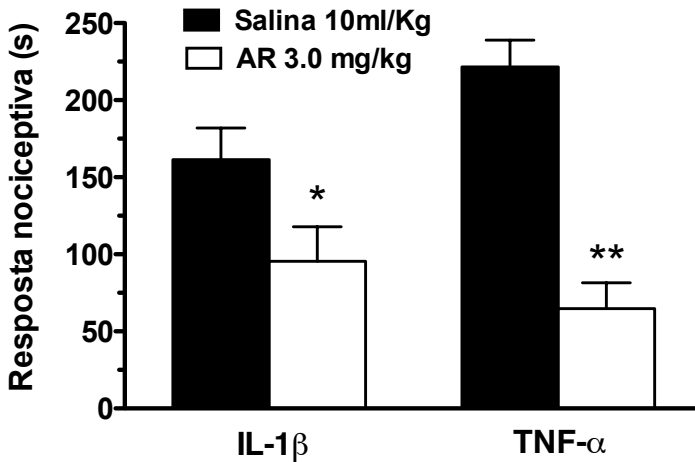


Legenda: Efeito da administração i.g. de AR (AR) (3,0mg/kg), sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA (450 pmol/sítio) (A), AMPA (135 pmol/sítio) (B), cainato (110 pmol/sítio) (C) e trans-ACPD (10 nmol/sítio) (D) em camundongos. Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. O símbolo denota o nível de significância * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (NMDA + veículo: coluna preta)(teste t de Student).

4.3.2 Efeito do ácido rosmarínico na nociceção induzida por citocinas pró-inflamatórias.

A citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β são capazes de gerar comportamento nociceptivo pela ativação direta dos nociceptores. Para avaliar o efeito do AR na reversão da ação nociceptiva gerada por estas citocinas, o TNF- α e IL-1 β foram injetadas intracalmente e o comportamento nociceptivo foi observado. A figura 13 mostra que o tratamento dos animais com AR (AR) (3.0mg/kg) via i.g. inibiu significativamente a nociceção causada tanto pela injeção i.t. de TNF- α quanto pela injeção i.t. de IL-1 β . As inibições máximas obtidas foram de $71 \pm 8\%$ para o TNF- α e $41 \pm 14\%$ para a IL-1 β .

Figura 13 – Efeito do AR sobre as citocinas pró-inflamatórias.

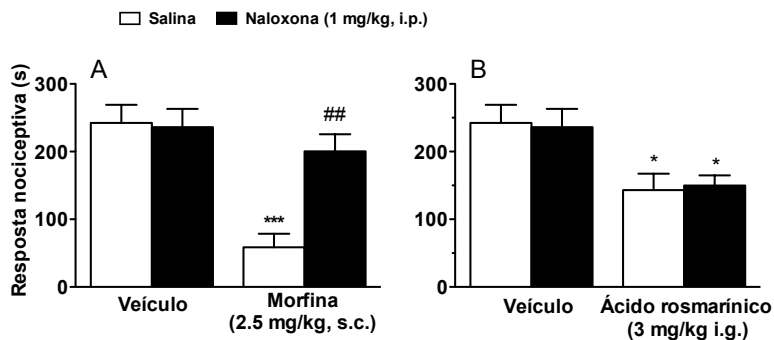


Legenda: Efeito da administração i.g. de AR (AR) (3.0mg/kg), sobre a nocicepção induzida pela injeção i.t. de IL-1β ou TNF-α (0,1 pg/sítio para cada citocina) em camundongos. Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância **P < 0,01 e *P < 0,05, comparado ao grupo controle (veículo: tween 80 5% + TNF-α ou IL-1β: colunas pretas)(teste t de Student).

4.3.3 Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico

O tratamento prévio dos animais com naloxona, um antagonista não-seletivo de receptores opióide (1 mg/kg, i.p.) reverteu significativamente o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) (Figura 14A), mas não reverteu o efeito antinociceptivo do AR (3 mg/kg, i.g.) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (Figura 14B).

Figura 14– Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do AR.

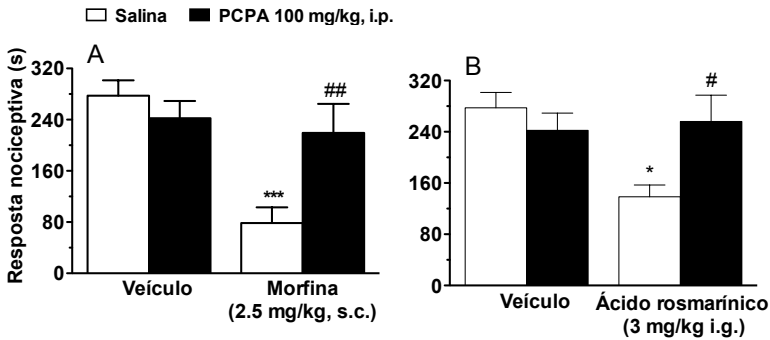


Legenda: Efeito do tratamento prévio dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do AR (3mg/kg, i.g.) e da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0.1$; *** $P < 0.001$ comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo: tween 80 5% e glutamato i.pl.), ## $P < 0,01$. ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keul's.

4.3.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico

Para verificar o possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do AR, os animais foram tratados previamente com PCPA, um inibidor da triptofano hidroxilase, enzima que participa da via de síntese da 5-HT (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos). O tratamento prévio com PCPA reverteu, de forma significativa, o efeito antinociceptivo promovido pelo AR (3 mg/kg, i.g.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Figura 15B). Do mesmo modo, reverteu o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) (Figura 15A).

Figura 15 – Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do AR.

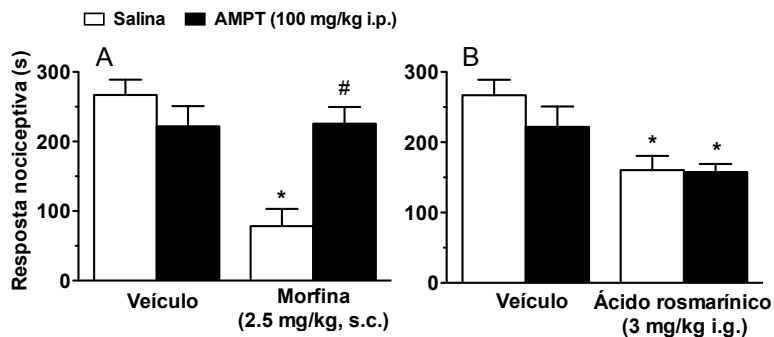


Legenda: Efeito do tratamento prévio dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos), sobre o efeito antinociceptivo do AR (3mg/kg, i.g.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,1$ comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo, Tween 80 5% e glutamato i.pl.), # $P < 0,1$ ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keul's.

4.3.5 Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico

Para verificar o possível envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do AR, os animais foram tratados previamente com a alfa metil para tirosina (AMPT) (100 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de noradrenalina, 4 horas antes do experimento. O tratamento prévio dos animais com AMPT não reverteu o efeito antinociceptivo promovido pelo AR (3 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Figura 16A). No entanto, o tratamento prévio com AMPT reverteu o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) (Figura 16B).

Figura 16 – Participação do sistema noradrenérgico no efeito antinociceptivo do AR.

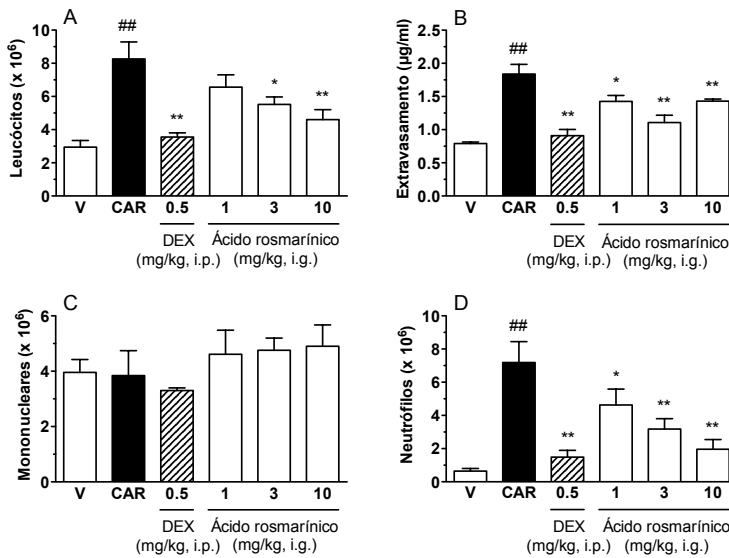


Legenda: Efeito do tratamento prévio dos animais com AMPT (100 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do AR (3mg/kg, i.g.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) do inibidor da síntese de noradrenalina. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,1$ comparado ao grupo veículo e # $P < 0,1$. ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keul's.

4.4 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO NA PERITONITE CAUSADA PELA CARRAGENINA

A figura 17 mostra que o tratamento dos animais com AR (1–10 mg/kg) pela via i.g. causou uma inibição significativa da inflamação induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina (750 μ g/cavidade), avaliada através da diminuição de leucócitos totais ($62 \pm 11\%$) com DI_{50} de 2,26 (1,03 - 4,99 mg/kg) (Figura 17 A), de neutrófilos ($79 \pm 8\%$) com DI_{50} de 8,92 (5,39-14,76mg/kg) (Figura 17 D) e diminuição do extravasamento (Azul de Evans) ($70 \pm 11\%$) (Figura 17 B), sem alterar significativamente o número de células mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos.

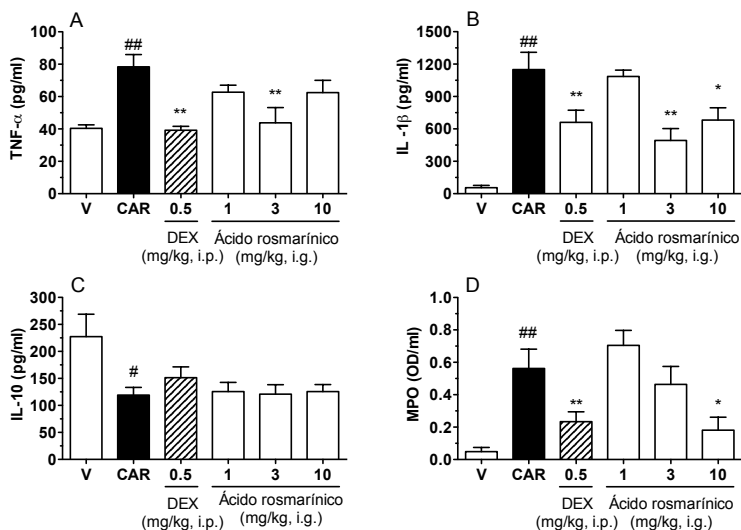
Figura 17 – Efeito do AR no modelo da peritonite induzida pela carragenina.



Legenda: Efeitos do AR na peritonite induzida pela carragenina em camundongos. (A) número de leucócitos totais, (B) extravasamento, (C) mononucleares e (D) neutrófilos. V, representa os animais tratados com veículo (tween 80 5% em NaCl, 0.9%, i.g.); CAR, representa os animais tratados com carragenina (750 µg/cavidade). Cada grupo representa a média ± EPM de 8 animais. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ comparados com grupos tratados com carragenina, ## $P < 0.01$ comparado com o grupo tratado com veículo (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

A figura 18 demonstra o efeito anti-inflamatório do AR pela via i.g. (3 mg/kg), sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (71 ±17%) (Figura 13A) e IL-1 β (60 ±10%)(Figura 18B), sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), na dose de 10 mg/kg (72 ±15%)(Figura 18D), sem alterar os níveis de IL-10 (Figura 13E) na cavidade peritoneal de camundongos.

Figura 18 – Efeito do AR sobre as citocinas inflamatórias e atividade da mieloperoxidase no modelo da peritonite induzida pela carragenina.

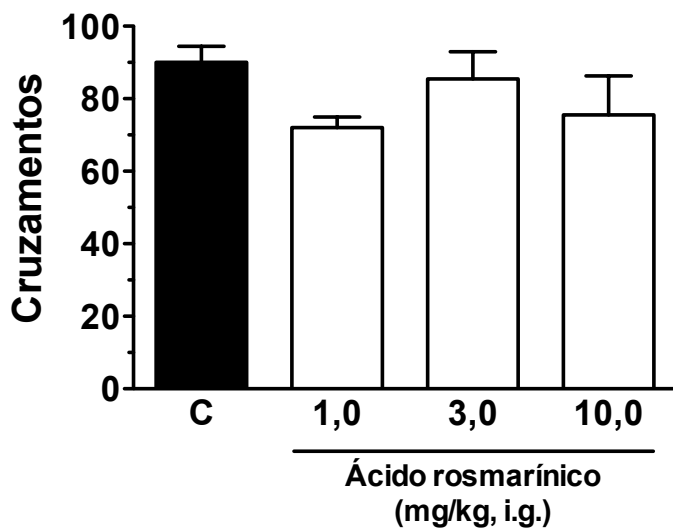


Legenda: Efeitos do AR na peritonite induzida pela carragenina em camundongos. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-10 e (D) atividade da mieloperoxidase na cavidade peritoneal. V, representa os animais tratados com veículo (tween 80 5% em NaCl, 0.9%, i.g.), CAR, representa os animais tratados com carragenina (750 μ g/cavidade). Cada grupo representa a média \pm EPM de 8 animais. Os símbolos denotam os níveis de significância $*P < 0.05$ e $**P < 0.01$ comparados com grupos tratados com carragenina, $##P < 0.01$ comparado com o grupo tratado com veículo (V) (ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keul's).

4.5 EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR NO TESTE DE ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA

O tratamento i.g. dos animais com o AR, nas doses (1-10mg/kg) utilizadas nos modelos de inflamação e de nocicepção química e térmica, não alterou a atividade locomotora espontânea dos camundongos quando avaliados durante 6 min no teste do campo aberto e comparados com o grupo controle (Figura 19).

Figura 19 – Efeito do AR sobre a atividade locomotora no modelo do campo aberto.



Legenda: Efeito do AR sobre a atividade locomotora espontânea em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$ a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

A dor está frequentemente associada a vários tipos de doenças como a lombalgia, fibromialgia, artrite reumatoide, enxaqueca, entre outras. Apesar dos avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na dor e do investimento considerável na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento nessa área, ainda existem poucas classes de fármacos analgésicas efetivamente eficazes no controle de alguns tipos de dor, como a dor crônica (WOODCOCK; WITTER; DIONNE, 2007). Além disso, as terapias farmacológicas disponíveis atualmente tais como, os anti-inflamatórios não esteroidais, os inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 e antidepressivos possuem efetividade limitada, além de efeitos colaterais severos (BOURINET et al., 2005). Por essa razão, a busca por novas moléculas que sejam farmacologicamente mais efetivas e com menos efeitos adversos é contínua e necessária.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a atividade antinociceptiva do AR em modelos de nocicepção aguda e crônica. Além disso, os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do AR foram também investigados. Outro objetivo deste estudo foi verificar a sua atividade anti-inflamatória no modelo de peritonite induzida pela carragenina.

O primeiro teste realizado para verificar se o AR possui efeito antinociceptivo foi o modelo de contorções induzidas pelo ácido acético. Neste estudo, o AR apresentou um efeito antinociceptivo dependente da dose. Estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo do AR pode estar relacionado à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios induzido pelo ácido acético. Isto porque o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo para avaliar a dor visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade, podendo ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Além disso, a presença do ácido acético na cavidade peritoneal promove uma irritação local e desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina (BK), a (SP) e as prostaglandinas (PGs), bem como algumas citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β (IKEDA et al, 2001). Ribeiro e colaboradores (2000) demonstraram que a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético ocorre devido à liberação de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-8 de macrófagos residentes peritoneais e mastócitos. Além disso, Feng e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz um

aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal.

Para descartar a possibilidade de que a inibição do comportamento nociceptivo promovido pelo AR poderia ocorrer pela redução da atividade locomotora, foi realizado o teste do campo aberto e observou-se que a administração do AR, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, não foi capaz de comprometer o desempenho motor dos animais, descartando, assim, a hipótese de que a redução do número de contorções abdominais esteja relacionada a um prejuízo motor induzido pela administração do AR. Como o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é considerado um teste de baixa especificidade, o AR também foi testado em outros modelos de nocicepção aguda e crônica para a confirmação do seu potencial antinociceptivo (analgésico).

Assim, o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina foi utilizado tendo em vista a sua importância, uma vez que por meio deste teste é possível induzir e avaliar as duas fases da dor: a fase neurogênica e a inflamatória. A nocicepção neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos e a nocicepção inflamatória é mediada pela combinação da sensibilização periférica e da medula espinal (TJØLSEN et al., 1992). Já está bem descrito que a injeção i.pl. de formalina em roedores produz um aumento da concentração de diferentes mediadores a nível espinal, como aminoácidos excitatórios (AEE), prostaglandina E2 (PGE2), NO, taucicinas, cininas e outros peptídeos (SANTOS; VEDANA; DE FREITAS, 1998; TJØLSEN et al., 1992; MALMBERG; YAKSH, 1995). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o AR inibiu, de forma dependente da dose, somente a nocicepção inflamatória (segunda fase) induzida pela injeção i.pl. de formalina, sem alterar significativamente a nocicepção neurogênica gerada na primeira fase do teste da formalina.

Como o AR demonstrou um claro efeito antinociceptivo no modelo do ácido acético e os aminoácidos excitatórios também estão envolvidos na nocicepção provocada pelo ácido acético, foi avaliado o efeito do AR em um modelo animal de nocicepção onde o agente alérgico é o principal neurotransmissor excitatório, o glutamato.

Neste modelo foi demonstrado que o AR produziu uma inibição significativa da resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato. Estudos realizados tanto em humanos (NORDLIND et al., 1993; WARNCKE; JORUM; STUBHAUG, 1997; GAZERANI et al., 2006) quanto em animais de laboratório (DAVIDSON; COGGESHALL; CARLTON, et al., 2001; CAIRNS; SESSLE; HU,

1998; DAVIDSON; CARLTON, 1998) têm demonstrado que aminoácidos excitatórios, como o glutamato, contribuem para o desenvolvimento e/ou manutenção da dor. Carlton e colaboradores (1995) demonstraram que a injeção i.pl. de L-glutamato induz hiperalgesia em ratos. Adicionalmente, a injeção i.pl. de agonistas específicos dos receptores glutamatérgicos, NMDA, AMPA, cainato ou DHPG (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos) promovem hiperalgesia mecânica e térmica passível de ser bloqueada pelos seus respectivos antagonistas (BHAVE et al., 2001; ZHOU et al., 2001). Beirith e colaboradores (2002) verificaram que a nocicepção causada pelo glutamato parece envolver locais de ação periférica, espinal e supraespinal sendo mediada tanto por receptores NMDA quanto receptores não-NMDA, bem como por via dependente de NO. Além disso, vários estudos têm demonstrado que receptores de aminoácidos excitatórios, como o NMDA, estão envolvidos na transmissão nociceptiva, auxiliando tanto no desenvolvimento quanto na manutenção do quadro doloroso (FERREIRA; SANTOS; CALIXTO, 1999). Então, os dados obtidos no presente estudo, assim como os dados da literatura, sugerem que a inibição causada pelo AR na nocicepção induzida por glutamato pode estar relacionada à sua interação com o sistema glutamatérgico.

Como comentado anteriormente, a dor aguda serve como um sistema de alerta para impedir algum possível dano ao organismo (SCHOLZ; WOOLF, 2002). No entanto, a dor crônica prejudica a qualidade de vida dos pacientes e é um dos principais problemas econômicos de saúde. Estimativas mostram que a prevalência da dor neuropática é acima de 5% na população em geral, causada principalmente por lesões do sistema nervoso periférico e central, onde um quarto desses sofre com intensidade severa (BARON et al., 2009). Por esta razão, a identificação dos mecanismos da dor e das possíveis aplicações terapêuticas em modelos animais de dor crônica se torna necessária.

Então, o próximo passo deste trabalho foi utilizar modelos experimentais que mimetizam a dor crônica. O estudo de dor crônica tem sido amplamente investigado em animais de laboratório, os quais podem ser submetidos a lesões do nervo, tanto periférico quanto central; estes modelos mimetizam a sensibilização e alterações plásticas ocorridas na dor neuropática (ZIMMERMANN, 2001). O primeiro modelo de dor crônica escolhido foi de mononeuropatia produzida pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos. A lesão do nervo periférico é frequentemente acompanhada pela inflamação local

transitória a qual provavelmente contribui para a estimulação dador neuropática. Vários mediadores inflamatórios como PGE₂, BK, NGF, histamina, 5-HT, IL-1 β , TNF- α , glutamato, endotelina-1 e quimiocinas, podem ser liberados de axônios ou de células de Schwann danificadas, ou células satélites, mastócitos e leucócitos infiltrados (JI; STRICHARTZ, 2004). Além disso, alguns estudos têm demonstrado importante envolvimento de receptores glutamatérgicos, principalmente dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em processos de dor neuropática (MAO et al., 1992; DICKENSON, 1997; YOSHIMURA; YONEHARA, 2006). Os resultados obtidos mostram que o AR reverte significativamente à hiperalgesia mecânica causada pela LPNC, além disso, a redução da hiperalgesia causada pelo AR não foi susceptível a tolerância. Esta conclusão é baseada nos dados que mostram que a interrupção do tratamento com o AR foi seguida pelo retorno completo da hiperalgesia e que o tratamento com o AR duas vezes por dia produziu efeito anti-hiperalgésico.

Os estados inflamatórios normalmente estão associados à dor decorrentes de dano tecidual, de exposição a estímulos químicos ou de processos autoimunes (SCHIENE: DE VRY; TZSCHENTKE, 2011). Independente da origem da inflamação, este processo envolve a liberação de mediadores inflamatórios como BK, PG, histamina e fatores de crescimento, os quais por sua vez levam à dor persistente por meio de ativação sustentada e sensibilização de nociceptores primários e de neurônios de segunda ordem envolvidos na transmissão do impulso nociceptivo (JULIUS; BASBAUM, 2001; MARCHAND et al., 2005). Esses processos, por sua vez, levam à sensibilização central e à hiperalgesia, percebidas como hiperalgesia e/ou alodínia (SCHIENE: DE VRY; TZSCHENTKE, 2011). Neste trabalho, um dos modelos utilizados para mimetizar um estado inflamatório crônico foi o modelo de inflamação periférica induzida pela injeção intraplantar de CFA, no qual a hiperalgesia foi avaliada por meio da aplicação de filamentos de von Frey (no caso da hiperalgesia mecânica).

Para a indução do processo inflamatório, o CFA injetado na pata dos animais foi utilizado inicialmente diluído a 50%. A escolha dessa concentração teve por objetivo induzir o processo inflamatório e a hiperalgesia com o mínimo de dano possível, suficiente apenas para demonstrar o efeito desejado. Esta concentração foi efetiva em desencadear a hiperalgesia mecânica, caracterizada pela diminuição do limiar de resposta dos animais às aplicações dos filamentos de von Frey. A hiperalgesia persistente causada pela injeção intraplantar de CFA resulta em dor inflamatória de longa duração, um efeito mediado por

vários mediadores inflamatórios como as citocinas, o glutamato, NO, PG, histamina, 5-HT e agentes imunológicos (RAGHAVENDRA; DELEO, 2004). Neste sentido, o presente estudo demonstrou claramente que o tratamento prolongado dos camundongos com o AR reduziu a hiperalgesia mecânica neste modelo de dor inflamatória crônica. É importante mencionar que este efeito do AR não foi susceptível a tolerância, pois a administração repetida do AR não causou diminuição do seu efeito.

Visto que, o AR demonstrou um importante efeito na dor crônica de origem inflamatória, foi avaliado o seu efeito em outro modelo de dor crônica, onde é possível avaliar tanto a dor de origem inflamatória quanto a dor neuropática. O modelo escolhido foi o de dor pós-isquemia crônica (DPIC). A partir deste modelo, informações adicionais sobre a SDCR, como mecanismos e diferentes abordagens terapêuticas podem ser mais compreendida. Sugere-se que a geração de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- κ B seja importante na indução da dor causada por este modelo (CODERRE; BENNETT, 2010). Neste modelo o AR também apresentou efeito antinociceptivo observado pela redução da hiperalgesia mecânica tanto nos animais testados a partir do segundo dia após o procedimento (dor inflamatória) quanto com os animais testados a partir do sétimo dia após o procedimento (dor neuropática) (Figuras 10 e 11). Este efeito do AR não foi susceptível a tolerância, assim como nos outros modelos de dor crônica utilizados.

Após a constatação de que o AR foi eficaz tanto em modelos de dor aguda quanto de dor crônica, iniciaram-se os estudos para determinar os possíveis mecanismos de ação pelo qual o AR exerce este efeito antinociceptivo.

O primeiro mecanismo a ser investigado foi a possível participação dos aminoácidos excitatórios no efeito antinociceptivo do AR, visto que, o efeito do AR, tanto nos modelos de nocicepção aguda (glutamato i.pl.), quanto nos modelos de nocicepção crônica (LPNC) envolvem mecanismos de neurotransmissão excitatória.

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, induz uma resposta nociceptiva por sua atuação em receptores glutamatérgicos que estão presentes em sítios de ação periférica, espinal e supraespinal (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; TODD; KOERBER, 2005). Existem 2 famílias de receptores glutamatérgicos, os ionotrópicos, AMPA, cainato e NMDA (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998), e os metabotrópicos, que são acoplados a proteína G e operam liberando segundos mensageiros ou influenciando canais iônicos pela interação das subunidades da proteína G (MELDRUM,

2000). Para verificar a possível influência do AR sobre a neurotransmissão glutamatérgica central, os animais foram tratados pela via i.g. com AR e a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção i.t. dos agonistas dos receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e pelo agonista do receptor metabotrópico (trans-ACPD). Os resultados obtidos demonstram que o AR inibe a nocicepção causada por NMDA, mas não inibe aquela causada por AMPA, cainato e trans-ACPD. Estes resultados explicam, em parte, a ação antinociceptiva do AR no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático, visto que, tal lesão provoca uma plasticidade neuronal dependente de receptores glutamatérgicos, principalmente do subtipo NMDA (DICKENSON et al., 1997; YOSHIMURA; YONEHARA, 2006). Dessa forma, estes resultados corroboram com a hipótese de que o sistema glutamatérgico espinal pode estar envolvido no efeito antinociceptivo central do AR, possivelmente por meio da interação com receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA). Estes resultados também explicam, em parte, o efeito antinociceptivo do AR no modelo da LPNC, podendo-se sugerir que o efeito antinociceptivo do AR, neste modelo, seria em parte, devido à inibição da ativação dos receptores NMDA, cuja ativação está diretamente relacionada com a transmissão da dor em nível central e que são responsáveis pela plasticidade neuronal desencadeada pela dor crônica gerada neste modelo.

Outros mediadores que estão envolvidos na modulação de processos nociceptivos são as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β . Sabe-se que essas citocinas, quando administradas intratecalmente, promovem um comportamento nociceptivo por induzir a liberação de glutamato e SP dos terminais nervosos (TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Parece haver uma importante relação entre essas citocinas pró-inflamatórias e o sistema glutamatérgico. Foi demonstrado que o TNF- α e a IL-1 β aumentam as correntes induzidas pelos receptores para NMDA e AMPA nos neurônios da lâmina II superficial do corno dorsal (KAWASAKI et al., 2008). Outros estudos demonstram que a IL-1 β modula a expressão do receptor AMPA em alguns neurônios do sistema nervoso central (LAI et al., 2006). Existem também algumas evidências de que existe uma interação recíproca entre receptores NMDA e de IL-1 β (HAGAN et al., 1996). Outros estudos mostram uma inter-relação dos receptores de TNF- α e receptores AMPA em distúrbios neuronais que envolvem o processo inflamatório (CHOI, 1994). Importante salientar que a IL-1 β pode facilitar a ativação do receptor para NMDA nos neurônios (VIVIANI et al., 2003; YANG et al., 2005; GUO et al., 2007). Como o AR inibiu a nocicepção induzida

pelo glutamato via i.pl. e pelo NMDA via i.t., e os aminoácidos excitatórios promovem a liberação de citocinas nas células de resposta imune como neutrófilos e mastócitos, decidiu-se investigar o efeito do AR na resposta nociceptiva induzida por TNF- α e IL-1 β e verificou-se que o AR inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de IL-1 β e TNF- α (Figura 15A e B). O efeito antinociceptivo do AR ocorre pela inibição de dois grupos distintos de moléculas, os aminoácidos excitatórios e as citocinas pró-inflamatórias, sendo que estes dois grupos de moléculas participam de diferentes processos nociceptivos e apresentam importantes interações entre si.

Alguns estudos evidenciam que aminoácidos excitatórios são liberados na medula espinal ou na pata do animal em processos inflamatórios (LAWAND; MCNEARNEY; WESTLUND, 2000; CARLTON, 2001). Além da participação das citocinas pró-inflamatórias na modulação de alguns receptores glutamatérgicos no SNC (LAI et al., 2006; HAGAN et al., 1996; CHOI, 1994), que poderiam afetar de forma inibitória a via glutamatérgica, Meotti e colaboradores (2007) demonstraram que o comportamento nociceptivo induzido pela injeção de IL-1 β e TNF- α também está associado com a fosforilação da p38 MAP cinase (p38MAPK). Durante o processo nociceptivo e inflamatório, a IL-1 β e o TNF- α ativam a via da p38MAPK que gera uma resposta positiva na dor e na inflamação porque ativa fatores transcricionais, como o NF- κ B, que regulam o gene responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias (JI e STRICHARSTZ, 2004; KAMINSKA, 2005; JI; WOOLF, 2001; WIDMANN et al., 1999).

A ativação de diferentes cinases pelo TNF- α . De fato, a aplicação tópica de TNF- α em raízes nervosas de ratos aumenta a fosforilação da cinase relacionada a sinais extracelulares (ERK) com um tempo de início de várias horas, enquanto que a aplicação aguda (5-15 min) de TNF- α em cultura de neurônios do GRD induz a fosforilação da cinase terminal c-Jun (JNK) e proteína cinase p38 (p38), mas não a ERK (POLLOCK et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2006).

Portanto, os resultados que demonstram a interferência direta do AR na ativação dos receptores NMDA e na ação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , apontam para uma influência deste princípio ativo tanto na geração, quanto na manutenção dos processos de nocicepção, principalmente os de origem inflamatória.

Além dos aminoácidos excitatórios e das citocinas pró-inflamatórias, outros mediadores são liberados tanto na dor aguda quanto na dor crônica, como por exemplo, a SP, o ATP, o NO, as PGs, o

neuropeptídeo Y, a CCK, alguns opióides, a adenosina, leucotrienos, tromboxanos, a somatostatina, a acetilcolina, a bradicinina, prótons e a 5-HT (MILLAN, 1999; GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006). No entanto, enquanto ocorre a ativação das vias nociceptivas ascendentes por estes mediadores, ocorrem também, importantes mecanismos de controle descendente da dor. Esses mecanismos se originam principalmente de neurônios serotoninérgicos, noradrenérgicos e opioidérgicos do tronco encefálico (BASBAUM; FIELDS, 1984) implicando diretamente os opióides endógenos, a 5-HT e a noradrenalina no controle da dor.

No presente estudo verificou-se que o sistema opióide não está envolvido na ação antinociceptiva do AR. Esta conclusão se deve ao fato de que o tratamento prévio dos animais com naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, administrado em uma dose que não altera a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato i.pl., inibe completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina, mas não interfere no efeito produzido pelo AR.

Da mesma forma, o presente estudo sugere também que o sistema noradrenérgico não está envolvido na ação antinociceptiva do AR. Esta conclusão originou-se da observação de que o tratamento prévio dos animais com AMPT, um inibidor da síntese de noradrenalina, administrado em uma dose que não é capaz de alterar a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato i.pl., inibe completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina, mas não interfere no efeito produzido pelo AR.

Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas dentro do SNC se originam de uma série de núcleos localizados na linha média do tronco encefálico, denominados de núcleos da rafe. Estes núcleos representam uma fonte de 5-HT neuronal sintetizada no encéfalo de mamíferos (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991). O núcleo magno da rafe (NMR) é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante em modular o controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM; FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). O sistema serotoninérgico rafe-espinhal se projeta do bulbo ventromedial rostral, incluindo o NMR, para o corno dorsal da medula espinhal por meio do funículo dorsolateral e de fibras não mielinizadas, modulando sensações dolorosas (MILLAN, 2002). Entretanto, o papel exercido pela 5-HT nos mecanismos de processamento nociceptivo na medula espinhal é controverso. Estudos de auto-radiografia revelaram a existência de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT₃ na medula espinhal. Também foi demonstrado que a ativação de alguns subtipos de

receptores serotoninérgicos, como 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃, produzem antinocicepção (MILLAN, 2002). Os resultados apresentados nesta tese sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do AR, uma vez que a depleção de 5-HT endógena com PCPA (inibidor da enzima triptofano hidroxilase) inibiu o efeito antinociceptivo promovido pelo AR nas mesmas condições que reverteu a antinocicepção causada pela morfina.

Como anteriormente o AR apresentou efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção causado por citocinas pró-inflamatórias e, além disso, apresentou um efeito antinociceptivo em modelos de dor crônica inflamatória, somado ao fato de que um crescente número de publicações vem demonstrando um efeito do AR em modelos de inflamação, decidiu-se testá-lo em um dos modelos de inflamação utilizados em nosso laboratório, o modelo da peritonite induzida pela carragenina.

A peritonite induzida pela carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda que é amplamente empregado para testar novas terapias anti-inflamatórias, a qual permite ao pesquisador quantificar ou analisar a permeabilidade vascular peritoneal e a migração celular, bem como as mudanças em outros parâmetros inflamatórios, tal como, a produção de citocinas (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Quatro horas após a injeção de carragenina ocorre um aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, aumento da atividade da enzima mieloperoxidase, aumento da exsudação em nível local e ainda participação de citocinas do tipo pró-inflamatórias (DA SILVA, et al., 2011; KOO et al., 2006). A injeção de carragenina resultou em um aumento no número de leucócitos totais e da exudação na cavidade peritoneal, representados principalmente pelo influxo de neutrófilos, quando comparados com o grupo controle (Figura 12A-D). Da mesma forma, a injeção de carragenina aumentou a atividade da MPO no lavado intraperitoneal comparado com o grupo controle (Figura 13D), confirmando o aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal (Figura 12D).

Neste modelo demonstrou-se claramente que o tratamento com AR (1-10 mg/kg) diminuiu significativamente o número de leucócitos e neutrófilos no líquido intraperitoneal (Figura 12A e D). Além disso, a dose de 10 mg/kg que causou a diminuição no número de neutrófilos, também reduziu o extravasamento (Figura 12B) e a atividade da MPO (Figura 12E). A dexametasona, usado neste teste como controle positivo, também reduziu o número total de leucócitos, representados principalmente por neutrófilos, assim como a atividade da MPO, sendo

que o efeito do AR foi semelhante à dexametasona nesses parâmetros. (Figura 12A-E).

Os neutrófilos são o principal subtipo celular que participa da defesa do organismo, e sua migração dos vasos sanguíneos para os tecidos é um processo crucial durante a resposta do hospedeiro contra infecções por microrganismos e/ou outros agentes nocivos (MALECH; GALLIN, 1987). Embora eles possuam um papel protetor na inflamação, o dano tecidual é uma consequência deletéria da intensa migração de neutrófilos, como observado nas doenças imunes inflamatórias (JONES et al., 1992; SMIDERLE et al., 2008). Além disso, durante a peritonite induzida pela carragenina, os leucócitos recrutados em conjunto com outras células sintetizam e liberam um grande número de mediadores, incluindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 (SHERWOODE; TOLIVER-KINSKY, 2004). Estas citocinas propagam a extensão do processo inflamatório local ou sistêmico, promovendo o recrutamento de leucócitos e a expressão de moléculas de adesão no local da inflamação (AMDEKAR et al., 2012).

Dentre as hipóteses que poderiam estar relacionadas com a inibição da migração leucocitária observada nos animais inflamados e tratados previamente com AR, estaria a hipótese da inibição destas citocinas pró-inflamatórias relacionadas a quimiotaxia de leucócitos. Então, nos nossos experimentos, o envolvimento desses mediadores pró-inflamatórios foram estudados e verificou-se que os camundongos submetidos a peritonite induzida pela carragenina tiveram um aumento nas concentrações de IL-1 β e TNF- α e redução das concentrações de IL-10 no fluido peritoneal (Figura 13A-C). O AR reduziu significativamente as concentrações de IL-1 β e TNF- α , mas não restaurou as concentrações de IL-10 (Figura 13A-C).

Outra evidência na literatura demonstra que o AR possui um importante papel no modelo de lesão pulmonar induzida por partículas de exaustão de diesel. Neste modelo o AR inibe a expressão de IL-1 β , quimiotática de queratinócito (KC), proteína-1 quimiotática de monócito (MCP-1), proteína-1 alfa inflamatória de macrófago (MIP-1 α), e o mRNA da NO sintase induzida (iNOS), bem como a formação de nitrorosina e 8-OHdG em camundongos (SANBONGI et al, 2004). JIANG e colaboradores (2009) sugerem que o efeito anti-inflamatório do AR na sepse ocorre em função da diminuição das concentrações local e sistêmica de um grande número de mediadores, como o TNF- α , a IL-6, e o HMGB1, o que bloqueia a via do fator nuclear Ikappa β pela inibição da atividade da Ikappa β cinase (JIANG et al., 2009).

Yang e colaboradores (2013) demonstraram que o AR inibe a expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular (ICAM), a molécula de adesão celular vascular (VCAM) e a E-Selectina. Estes efeitos reduzem a adesão dos monócitos e a migração nas células endoteliais da veia umbilical (HUVECs). Além disso, o AR inibiu em 40% a mortalidade na sepse induzida por punção ou ligadura cecal em camundongos, em um teste de 120 horas de duração (YANG et al., 2013). Luan e colaboradores (2013) demonstraram que o AR também possui importantes efeitos neuroprotetor durante a lesão encefálica induzida por isquemia/reperfusão por diabetes, incluindo uma diminuição no volume do infarto e alívio do dano encefálico por reduzir a HMGB1 e a expressão de I κ B- α e NF- κ B no tecido encefálico isquêmico. Neste trabalho demonstramos que o AR também possui um importante efeito antinociceptivo no modelo do DPIC, que é também um modelo de isquemia/reperfusão. Este efeito antinociceptivo poderia se explicado, pelo menos em parte, pelo mecanismo neuroprotetor de AR descoberto por Luan e colaboradores (2013), visto que, de acordo com estes autores, o AR reduz a expressão de NF- κ B que é estimulado por sua vez pelo TNF- α , cujo efeito antinociceptivo também foi abolido pelo AR, como observado neste trabalho.

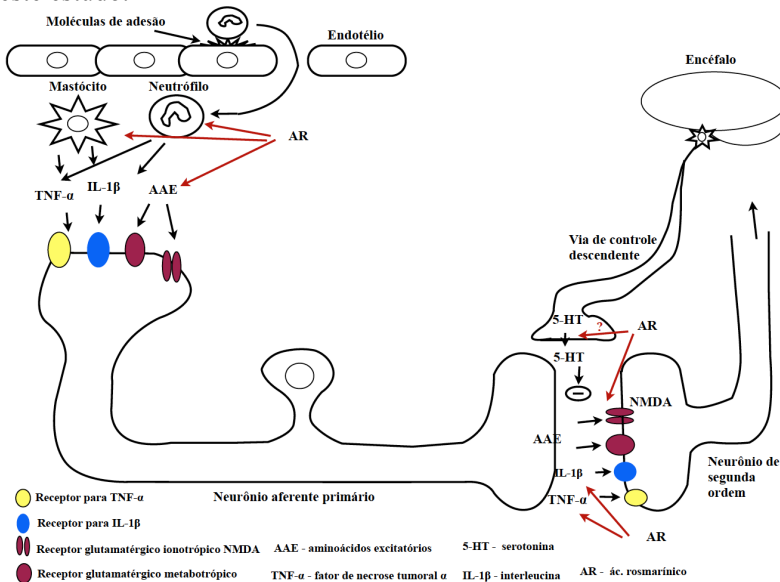
Com base nos resultados obtidos no experimento da inflamação induzida pela carragenina, somado aos resultados anteriores do AR sobre modelos de dor inflamatória aguda provocada pelo ácido acético e pela formalina, e dor crônica provocada por CFA, ligadura do nervo ciático e isquemia, e também sobre os efeitos diretos no AR sobre a nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias, nós propomos um modelo para sinalização induzida pelo AR (Figura 20). Primeiro, o AR diretamente ou indiretamente inibe a migração celular e reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação. Segundo, o AR inibe diretamente a produção ou liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , e reduz com isso, a liberação de outros mediadores inflamatórios e álgicos que são responsáveis pela indução e manutenção da dor e da inflamação. Finalmente, de acordo com a literatura, o AR inibiria a via da Ikappa β cinasee modularia o fator nuclear kappa β , contribuindo, deste modo, para a redução da resposta inflamatória e da dor.

Coletivamente, os resultados apresentados demonstram que ao AR possui um importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório tanto em modelos de nocicepção aguda quanto crônica, quanto de inflamação aguda e crônica, sendo que seu mecanismo de ação parece necessitar, pelo menos em parte, da ativação do sistema serotoninérgico e

envolver a inibição dos receptores ionotrópicos (tipo NMDA) para glutamato e a via de sinalização dependente das citocinas pró-inflamatórias.

Desta forma, o AR pode se tornar uma substância útil para o desenvolvimento de novos fármacos de interesse terapêutico no controle da dor e inflamação aguda e crônica, tendo em vista que a ativação do sistema glutamatérgico é preponderante nestas situações. Os prováveis sítios para a ação do AR estão representados na Figura 20.

Figura 20– Mecanismos de ação farmacológicos do AR encontrados neste estudo.



Legenda. Prováveis mecanismos envolvidos nos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do AR. O presente estudo demonstra que o efeito antinociceptivo promovido pelo AR deve-se à inibição de receptores glutamatérgicos NMDA. O AR também pode promover a liberação de 5-HT por meio de neurônios descendentes inibitórios no corno dorsal da medula espinhal os quais podem ativar seus receptores específicos acoplados a proteína G inibitória (Gi), resultando em abertura de canais de K⁺ e inibição da transmissão nociceptiva. Ou ainda o AR, por antagonizar os receptores NMDA, poderá: 1) promover a síntese de 5-HT; 2) aumentar o efeito antinociceptivo dos opióides endógenos. O presente estudo também demonstra que o efeito anti-inflamatório do AR deve-se a diminuição da quantidade de neutrófilos e macrófagos o que provavelmente diminui as concentrações de TNF-α e IL-1β na cavidade peritoneal.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que:

- O AR possui um importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda;
- O AR apresenta efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção crônica de origem neuropática e inflamatória;
- O efeito anti-inflamatório do AR é confirmado no modelo da peritonite induzida pela carragenina através da sua capacidade de diminuir o número de leucócitos totais, do número de neutrófilos e das citocinas pró-inflamatórias;
- O AR é capaz de inibir diretamente a nocicepção induzida pela injeção i.t. de TNF- α , IL-1 β e NMDA e o efeito antinociceptivo do AR é dependente de serotonina;

Assim, o conjunto de dados apresentados nesta tese demonstra que o AR apresenta potencial e sugere a realização de estudos futuros visando tornar esta substância útil para o desenvolvimento de fármacos de interesse terapêutico no controle da dor e inflamação aguda e crônica.

7 REFERÊNCIAS

- AMDEKAR, S. et al. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. *International Journal of Inflammation*. v. 2012, p. 1-6, 2012.
- ALKAM, T. et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). *Behavioural Brain Research*. v. 180, p. 139-145, 2007.
- AYRANCI, E.; ERKAN, N. Radical scavenging capacity of methanolic *Phillyrea latifolia* L. extract: anthocyanin and phenolic acids composition of fruits. *Molecules*. v. 18, n. 2, p. 1798-810, 2013.
- AZAMI, J.; LLEWELYN, M. B.; ROBERT, M. H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain*. v. 12, n. 3, p. 229-246, 1982.
- BARON, A. et al. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 277, n. 52, p. 50463-8, 2002.
- Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. v. 1, n. 211, p. 39-50, 2012.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*. v. 7, n. 1, p. 309-338, 1984.
- BEEKHUIZEN, H.; VAN FURTH, R. Monocyte adherence to human endothelium. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 4, p. 363-378, 1993.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate in the mouse paw. *Brain Research*. v. 924, p. 219-228, 2002.

BHAVE, G. et al. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nature Neuroscience*. v. 4, p. 417-423, 2001.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology*. v. 453, n. 2-3, p. 203-8, 2002.

BOURINET, E. et al. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO Journal*. v. 24, n. 2, p. 315-24, 2005.

BRODIE, M. S.; PROUDFIT, H. K. Hypoalgesia induced by the local injection of carbachol into the nucleus raphe magnus. *Brain Research*. v. 291, n. 2, p. 337-342, 1984.

BULGAKOV, V. P.; INYUSHKINA, Y. V.; FEDOREYEV, S. A. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 32, n. 3, p. 203-217, 2012.

CAIRNS, B. E.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. *Journal of Neuroscience*. v. 18, p. 8056-8064, 1998.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 106, p. 179-208, 2005.

CALIXTO, J. B. et al. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Current Opinion in Anaesthesiology*. v. 14, n. 5, p. 519-26, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 33, p. 179-189, 2000.

CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 1, n. 1, p. 52-6, 2001.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Neuroscience Letter*. v. 197, p. 25-28, 1995.

CHOI, D. W. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic death. *Progress in Brain Research*. v. 100, p. 47-51, 1994.

CHOI, H. R. et al. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy Research*. v. 16, p. 364-367, 2002.

CHOI, S. S. et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. *Life Science*. v. 73, n. 4, p. 471-85, 2003.

CHU, X. et al. Effects of a Natural Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, Rosmarinic Acid, on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Molecules*. v. 17, p. 3586-3598, 2012.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A Hypothesis for the Cause of Complex Regional Pain Syndrome-Type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. *Pain Medicine*, v. 11, p. 1224-1238, 2010.

Coderre, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*, v. 112, p. 94-105, 2004.

COLLIER, H. O. J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, R. S. et al. Ocimum gratissimum Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *International Immunopharmacology*. v. 13, p. 126-134, 2012.

COX, J. J. et al. Congenital insensitivity to pain: novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. *Human Mutation*. v. 31, p. 1670-1686, 2010.

DASTMALCHI, K. et al. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, n. 2, p. 867-871, 2009.

DA SILVA, M. D. et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. p. 9, 2011.

DA SILVA, T. et al. Drug package inserts and the adequacy of patient's drug information. *Revista de Saúde Publica*. v. 34, n. 2, p. 184-189, 2000.

DAVIDSON, E. M.; COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Peripheral NMDA and nonNMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. *Neuroreport*. v. 8, p. 941-946, 1997.

DAVIDSON, E. M.; CARLTON, S. M. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. *Brain Research*. v. 785, p. 136-142, 1998.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: Besson, M. J.; Dickenson, A. *The pharmacology of Pain*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 21-41.

DOBKIN, P. L.; BOOTHROYD, L. J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. *Pain Medicine*. v. 9, n. 7, p. 881-9, 2008.

DOWNEY, G. P.; FIALKOW, L.; FUKUSHIMA, T. Initial interaction of leukocytes within the microvasculature: deformability, adhesion, and transmigration. *New Horizons*. v. 3, p. 219-228, 1995.

DUBOIS, M. et al. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: Discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 51, n. 8, p. 2575-2579, 2008.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 38, p. 137-143, 1993.

FALLARINI, S., et al. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *British Journal of Pharmacology*. v. 157, n. 6, p. 1072-84, 2009.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science*. v. 55, p. 225-276. 1966.

FATHIAZAD, F. et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 20, n. 1, p. 87, 2012.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology*. v. 98, 729-733. 2003.

FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology*. v. 38, p. 835-842, 1999.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual Review of Neuroscience*. v. 14, n. 1, p. 219-245, 1991.

FIGUEIREDO, S. M. et al. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 135, n. 3, p. 603-609, 2011.

FRANÇA, E. et al. Association between socioeconomic factors and infant deaths due to diarrhea, pneumonia, and malnutrition in a metropolitan area of Southeast Brazil: a case-control study. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 17, n. 6, p. 1437-47, 2001.

GAO, L. P.; WEI, H. L.; ZHAO, H. S.; XIAO, S. Y.; ZHENG, R. L.; Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*. v. 60, n. 1, p. 62-65, 2005.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Chemokines, neuronal –glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 126, p. 56–68, 2010.

GARLAND, G. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary Care*. v. 39, n. 3, p. 561-71, 2012.

GAZERANI, P. Effects of subcutaneous administration of glutamate on pain, sensitization and vasomotor responses in healthy men and women. *Pain*. v.124, p. 338-348, 2006.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 100, p. 43-49, 2005.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON P.; DOERING L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. *Biological Research for Nursing*. v. 7, n. 4, p. 297-312, 2006.

GUO, W. et al. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *Journal of Neuroscience*. v. 27, n. 22, p. 6006-18, 2007.

HAGAN, P. et al. Intracerebral NMDA injection stimulates production of interleukin –1 beta in perinatal rat brain. *Journal of Neurochemistry*. v. 67, p. 2215-2218, 1996.

HOOKE, C. W.; LOTT, W. B.; HARRICH, D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *Journal of Virology*. v. 75, p. 3095–3104, 2001.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. *Research Immunology*. v. 147, n. 7, p. 417-434, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *European Journal of Pharmacology*. v. 67, n. 2-3, p. 313-6, 1980.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Science*. v. 69, n. 24, p. 2911-9, 2001.

JI, R. R.; Woolf, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology of disease*. v. 8, p. 1-10, 2001.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Science Signaling*. v. 2004, n. 252, p. reE14, 2004.

JIANG, W.L. et al. Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting pro inflammatory factor release and ameliorating hemodynamics. *Shock*. v. 32, p. 608-613, 2009.

JESSE, C. R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C. W. Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis-selenide in mice. *Brain Research*. v. 1231, p. 25-33, 2008.

JONES, A. K. et al. In vivo leukocyte migration in arthritis. *Arthritis Rheumatoid*. v. 34, p. 270-275, 1991.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KANG, M.; YUN, S.; WON, J. Rosmarinic acid inhibits Ca²⁺-dependent pathways of Tcell antigen receptor-mediated signaling by inhibiting the PLC-gamma 1 and I κ k activity. *Blood*. v. 101, p. 3534, 2003.

KAMINSKA, B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1754, p. 253-262, 2005.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity

in the superficial spinal cord. *Journal of Neuroscience*. v. 28, n. 20, p. 5189-94, 2008.

KELM, M. A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*. v. 7, p. 7–13, 2000.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T. Studies on the activities of tannins and related compounds, X: effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Natural Products*. v. 50, p. 392–399, 1987.

Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KOMES, D., et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis*. v. 22, n. 2, p. 172-80, 2011.

KOO, H. J. et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 103, n. 3, p. 496-500, 2006.

LAI, A.Y. et al. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroimmunology*. v. 175, p. 97-106, 2006.

LAWAND, N. B.; MCNEARNEY T.; WESTLUND K. N. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. *Pain*. v. 86, n. 1-2, p. 69-74, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animals models of nociception. *Pharmacological Reviews*. v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, H. J. et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*. v. 250, p. 109-115, 2008.

LEE, J.; KIM, Y. S.; PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochemical Pharmacology*. v. 74, n. 7, p. 960-968, 2007.

LEE, J., et al. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK- β in TNF- α -induced upregulation of CCL11 and CCR3. *British Journal of Pharmacology*. v. 148, p. 366-75, 2006.

LI, L.; TIAN, J. W.; LIANG, X. G. Regression of atherosclerosis by Rosmarinic acid via regulating lipid metabolism and anti-inflammatory actions. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v. 44, n. 4, p. 719-719, 2008.

LI, X.; QIN, J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *Journal of Molecular Medicine*. v. 83, n. 4, p. 258-66, 2005.

LIGHT, A. R.; CASALE, E. J.; MENETREY, D. M. The effects of focal stimulation in nucleus raphe magnus and periaqueductal gray on intracellularly recorded neurons in spinal laminae I and II. *Journal of Neurophysiology*. v. 56, n. 3, p. 555-571. 1986.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

Loeser, J. D.; Melzack R. Pain: an overview. *Lancet*. v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 142, n. 1, p. 59-64, 2012.

LONGO, D.L. et al, 2012. *Harrison Manuals of Medicine*. 18 th edition. New York: Mac Graw Hill Medical, 2012. 1451 p.

LUAN, H. et al. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. *Journal of Neuroinflammation*. v. 10, p. 1-10, 2013.

Lucarini, R.; Bernardes, W. A.; Ferreira, D. S.; Tozatti, M. G.; Furtado, R.; Bastos, J. K.; Pauletti, P. M.; Januário, A. H.; Silva, M. L.; Cunha,

W. R. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology*. v. 51, n. 9, p. 1087-1090, 2013.

MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *New England Journal of Medicine*. v. 317, p. 687-694, 1987.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. *Pain*. v. 76, p. 215-222, 1998.

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. *The Journal Neuroscience*. v. 15, p. 2768-2776, 1995.

MANFREDI, M. et al. Congenital absence of pain. *Archives of Neurology*. v. 38, n. 8, p. 507-11, 1981.

MAO, J. et al. Pain-related increases in spinal cord membrane-bound protein kinase C following peripheral nerve injury. *Brain Research*. v. 588, n. 1, p. 144-9, 1992.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 7, p. 521-32, 2005.

MARSHALL, B. T. et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*. v. 423, n. 6936, p. 190-3, 2003.

MAŠKOVIĆ, P. et al. Phenolic compounds and biological activity of *Kitabelia vitifolia*. *Journal of Medical Food*. v. 14, n. 12, p. 1617-23, 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000.
- MEOTTI, F. C. et al. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin:evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 316, n. 2, p. 789-96, 2006.
- MEOTTI, F. C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S. The nociception induced byglutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. v. 11, n. 6, p. 570-8, 2010.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. Seattle: IASP Press. 1994.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. v. 66, p. 355-474, 2002.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.
- MONTANHER, A. B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 109, n. 2, p. 281-8, 2007.
- NAKAGAWA, T.; KANEKO, S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for neuropathic pain. *Journal of Pharmacological Sciences*. v. 114, p. 347–353, 2010.
- NATHAN, C. Fresh approaches to anti-infective therapies. *Science Translational Medicine*. v. 4, n. 140, p. 140, 2012.
- NAVRATILOVA, E.et al.. Evaluation of reward from pain relief. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 1282, p. 1-11, 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. *Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures*. In: WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Elsevier. p. 159-186. 2008.

NORDLIND, K. et al. Glutamate- and aspartate-like immunoreactivities in human normal and inflamed skin. *Virchows Archiv. B. Cell Pathology Including Molecular Pathology*. v. 64, p. 75-82, 1993.

OLESSON, T. D.; TWOMBLY, D. A.; LIEBENSKIND, J. C. Effects of pain attenuating brain stimulation and morphine on electrical activity in the raphe nuclei of the awake rat. *Pain*. v. 4, n. 3, p. 211-230, 1978.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.

PAGANO, R. L. et al. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators of Inflammation*. v. 11, n. 4, p. 203-10, 2002.

PAPA, L.; GOMES, E.; ROCKWELL, P. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death. *Apoptosis*. v. 12, n. 8, p. 1389-405, 2007.

PEREIRA, P. et al. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacology Research*. v. 52, n. 3, p. 199-203, 2005.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. *Nature Review Neuroscience*. v. 8, n. 1, p. 71-80, 2007.

PETERSON, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. v. 62, p. 121-125, 2003.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. v. 56, n. 3, p. 237-43, 2001.

POLLOCK, J. et al. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology*. v. 42, n. 1, p. 93-106, 2002.

QIAO, S. et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radicals Research*. v. 39, p. 995-1003, 2005.

- QUINTÃO, N. L. et al. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology*. v. 50, n. 5, p. 614-20, 2006.
- RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J. A. The role of astrocytes and microglia in persistent pain. *Advanced Molecular Cell Biology*. v. 31, p. 951–966, 2004.
- RATES, S.M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*. v. 39, p. 603-613, 2001.
- REN, P. et al. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. v. 39, p. 220–225, 2009.
- RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*. v. 387, n. 1, p. 111-8, 2000.
- RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *Journal of Immunology*. v. 190, n. 8, p. 3831-8, 2013.
- ROY, D.; MUKHOPADHYAY, S. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*. *Indian Journal of Experimental Biology*. v. 50, n. 11, p. 817-25, 2012.
- SANBONGI, Y. et al. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 48, n. 6, p. 2244-50, 2004.
- SAHU, A.; RAWAL, N.; PANGBURN M. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochemical Pharmacology*. v. 57, p. 1439–46, 1999.
- SALIN, O. P., et al. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute Chlamydia

pneumoniae infection in vitro. *Journal of Antibiotics*. v.64, n. 11, p. 747-52, 2011.

SALTAS, D. et al. Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 61, n. 13, p. 3235-41, 2013.

SANBONGI, C. et al. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 34, p. 1060–1069, 2003.

SANBONGI, C. et al. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clinical & Experimental Allergy*. v. 34, n. 6, p. 971-977, 2004.

SANCHEZ-CAMPILLO, M. et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food and Chemical Toxicology*. v. 47, n. 2, p. 386-392, 2009.

SANTOS, A. R. et al. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *European Journal of Pharmacology*. v. 379, n. 1, p. 7-17, 1999a.

SANTOS, A. R.; VEDANA, E. M.; DE FREITAS, G. A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflammation Research*. v. 47, n. 7, p. 302-7, 1998.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ricerca Science*. v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCHIENE, K.; DE VRY J.; TZSCHENTKE T. M. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 339, n. 2, p. 537-44, 2011.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*. v. 5 Suppl, p. 1062-7, 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. *Pain*. v. 43, p. 205-218, 1990.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIMOJO, Y. et al. Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. v. 88, p. 896-904, 2010.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocytereruitment during inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*. v. 7, p. 151-185, 2005.

SINKOVIC, A. et al. Rosemary extracts improve flow-mediated dilatation of the brachial artery and plasma PAI-1 activity in healthy young volunteers. *Phytotherapy Research*. v. 3, p. 402-7, 2011.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal Pharmacology*. v. 597, p. 86-91, 2008.

SOTNIKOVA, R. et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 65, n. 5, p. 713-23, 2013.

STASHENKO, E. E. et al. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*. v. 36, n. 1, p. 192-202, 2013.

STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. v. 98, n. 21, p. 11845-11846, 2001.

SWARUP, V. et al. Antiviral e anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v 51, n. 9, p. 3367-3370, 2007.

TADANO, T. et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Science*. v. 65, n. 3, p. 255-61, 1999.

TAKAHASHI, N. et al. TNF-alpha and phosphorylation of ERK in DRG and spinal cord: insights into mechanisms of sciatica. *Spine (Phila Pa 1976)*. v. 31, n. 5, p. 523-9, 2006.

TEWTRAKUL S. et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. *Phytotherapy Research*. v. 17, n. 3, p. 232-9, 2003.

TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation e molecular interaction. *Toxicon*. v. 46, p. 318-327, 2005.

TJOLSEN, A. et al The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TODD, A. J.; KOERBER, H. R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. Melzack and Wall's textbook of pain. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2005.

Tracey, I.; Mantyh, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

UNDERHILL, D. M. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunological Reviews*, v. 219, p. 75-87, 2007.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. v. 47, n. 1, p. 113-9, 2012.

WARNCKE, T.; JORUM, E.; STUBHAUG, A. Local treatment with the N-methyl-Daspartate receptor antagonist ketamine, inhibits development of secondary hyperalgesia in man by a peripheral action. *Neuroscience Letters*. v. 227, p. 1-4, 1997.

- VIVIANI, B. et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *Journal of Neuroscience*. v. 23, n. 25, p. 8692-700, 2003.
- VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*. v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.
- WIDMANN, C. et al. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews*. v. 79, p. 143-180, 1999.
- WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. v. 6, n. 9, p. 703-10, 2007.
- WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*. v. 55, n. 3, p. 353-64, 2007.
- YANG, S. et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. *Brain Research*, v. 1034, n. 1-2, p. 172-9, 2005.
- YANG, E. J. et al. Barrier protective effects of rosmarinic acid on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *Journal of Cell Physiology*. v. 228, n. 5, p. 975-982, 2013.
- YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal*. v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.
- YOSHIMURA, M.; YONEHARA, N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neuroscience Research*. v. 56, n. 1, p. 21-28, 2006.
- ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. v.16, p.109-110, 1983.

ZHUO, M.; WU, G.; WU, L. J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Molecular Brain*. v. 4, p. 31, 2011.

ZHOU, S. et al. Metabotropic glutamate 1alpha receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. *Brain Research*. v. 91, p. 18-26, 2001.