

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVAS, ANTIINFLAMATÓRIAS E ANTI-
ALÉRGICAS DO POLIGODIAL, SESQUITERPENO ISOLADO DAS CASCAS
DA *DRYMIS WINTERI***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Callxto

GILBOÉ LANGARO MENDES
Florianópolis
1998

MENDES, Gilboé Langaro. *Atividades antinociceptivas, antiinflamatórias e antialérgicas do poligodial, sesquiterpeno isolado das cascas da Drymis winteri*. Florianópolis, 1998. 128p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: João Batista Calixto

Defesa: 28/05/98

Estudo das ações [antinociceptivas], [antiinflamatórias] e [antialérgicas] do [poligodial], em modelos de [dor], de [inflamação] e de [alergia] e dos mecanismos envolvidos nas ações do composto. O poligodial causou efeito antinociceptivo nos testes de dor induzida pela injeção de [ácido acético], [caolim], [zimosan], [formalina] e [capsaicina]. O [mecanismo] pelo qual o poligodial produz suas ações antinociceptivas está sob investigação, mas uma interação com o [sistema opióide], com receptores de [serotonina], [adrenérgicos α_1], com as [taquicininas], e com mecanismos dependentes de [proteína G_i/G_o] sensíveis ao tratamento com [toxina pertussis] têm um importante papel modulatório nas suas ações antinociceptivas. O poligodial causou ainda efeito [antiinflamatório] testado nos edemas de pata induzidos por [bradicinina], [carragenina], [dextrana], [fosfolipase A_2], [prostaglandina E_2] e [substância P], nos edemas de orelha induzidos por [ácido araquidônico], [capsaicina] e [óleo de cróton] e inibiu a migração celular para a cavidade pleural na [pleurisia] induzida pela [carragenina]. Tem também propriedades [antialérgicas] quando testado em animais sensibilizados à ovoalbumina.

[testes placa quente, rota-rod, pleurisia, capsaicina, formalina, contorções abdominais] [bradicinina] [carragenina] [dextrana] [fosfolipase A_2] [prostaglandina E_2] [substância P] [ácido araquidônico] [óleo de cróton]

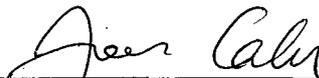
**“ATIVIDADES ANTI-NOCICEPTIVAS, ANTI-INFLAMATÓRIAS
E ANTI-ALÉRGICAS DO POLIGODIAL, SESQUITERPENO
ISOLADO DAS CASCAS DA *DRYMIS WINTERI*”**

POR

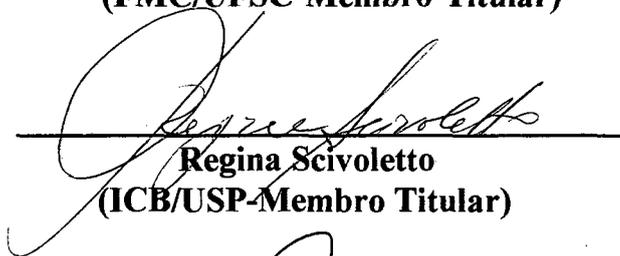
GILBOÉ LANGARO MENDES

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



**João Batista Calixto
(FMC/UFSC-Membro-Titular)**



**Regina Scivoletto
(ICB/USP-Membro Titular)**



**Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 28 de Maio de 1998.

Este trabalho é dedicado a minha querida esposa Nelma Mendes, que, com seu sacrifício, amor, carinho, compreensão e incentivo, tornou possível a realização de um grande sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor João Batista Calixto, pelo exemplo e competência. Registrarei sempre o orgulho e o privilégio de ter sido seu aluno.

Ao Departamento de Química, especialmente ao professor doutor Valdir Cechinel Filho, pela presteza no atendimento das nossas necessidades e pela riqueza espiritual dos contatos mantidos.

Ao professor doutor Giles Rae, não apenas coordenador do curso de pós-graduação, mas um ser humano de raro valor interior.

A todos os professores do departamento, que, além da dedicação e competência, permitiram que os sentisse como amigos.

Aos funcionários do departamento, todos gentis, atenciosos, carinhosos, dignificantes da instituição que representam.

Aos meus colegas de turma, Irinéia, Josélia, Marcos, Maria Martha, Rose, Rubens, Sandro e Tânia que permitiram incorporar à minha vida o patrimônio inestimável das suas amizades.

Aos colegas Adair, Maria Martha e Tânia Saleh, que, além da sua amizade, ofereceram sua competência técnica para que o meu trabalho fosse desenvolvido com qualidade.

A todos os demais colegas, que, certamente, dispensaram ao menos um sorriso amigo, tornando mais fácil o enfrentamento de cada dia.

Ao meu sobrinho Ricardo, pelo carinho, paciência, solicitude; um verdadeiro guardião para que o computador também se fizesse meu amigo.

À Universidade de Passo Fundo, que tem permitido ao longo da minha vida exercitar a maravilhosa arte do ensino e da convivência.

Jamais me senti desamparado. Deus esteve sempre comigo.

ÍNDICE.....	PÁG.
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais	30
3.2 Classificação botânica da <i>Drymis winteri</i>	30
3.3 Análise química e preparação do composto poligodial.....	31
3.4 Análise farmacológica.....	32
3.4.1 Atividade antinociceptiva	32
3.4.1.1 Teste das contorções abdominais em camundongos.....	32
3.4.1.2 Dor induzida pela formalina em camundongos.....	33
3.4.1.3 Dor induzida pela capsaicina em camundongos.....	35
3.4.1.4 Teste da placa quente em camundongos.....	36
3.4.1.5 Efeito sobre a performance motora (<i>rota-rod</i>) em camundongos.....	37
3.4.1.6 Hiperalgesia induzida pelo glutamato em camundongos.....	37
3.4.2 Estudo do mecanismo de ação analgésica do poligodial.....	38
3.4.2.1 Influência do pré-tratamento com naioxona.....	38

3.4.2.2	Influência do pré-tratamento com ioimbina e prazosin	39
3.4.2.3	Influência do pré-tratamento com L-arginina.....	39
3.4.2.4	Influência do tratamento com faclofen e bicuculina.....	40
3.4.2.5	Influência do pré-tratamento com PCPA.....	40
3.4.2.6	Influência do pré-tratamento com toxina pertussis.....	41
3.4.2.7	Influência do pré-tratamento com glibenclamida.....	42
3.4.2.8	Influência da adrenalectomia.....	42
3.4.2.9	Desenvolvimento de tolerância cruzada entre morfina e poligodial.....	43
3.4.3	Atividade antiinflamatória.....	44
3.4.3.1	Edema de pata em camundongos.....	44
3.4.3.2	Edema de orelha em camundongos.....	45
3.4.3.3	Modelo da pleurisia em camundongos.....	45
3.4.4	Atividade antialérgica.....	47
3.4.4.1	Choque anafilático em camundongos	47
3.4.4.2	Edema alérgico em ratos.....	48
3.5	Drogas e soluções.....	48
3.6	Análise estatística.....	49
4	RESULTADOS.....	51
4.1	Efeito do poligodial no teste das contorções abdominais.....	51
4.2	Dor induzida pela formalina.....	51
4.3	Dor induzida pela capsaicina.....	58
4.4	Efeito do poligodial no teste da placa quente.....	60

4.5 Efeito do poligodial na performance motora (<i>rota-rod</i>).....	60
4.6 Efeito do poligodial na hiperalgesia induzida pelo glutamato.....	60
4.7 Mecanismo de ação antinociceptiva do poligodial.....	64
4.7.1 Influência do pré-tratamento com naioxona.....	64
4.7.2 Influência do pré-tratamento com ioimbina e prazosin.....	64
4.7.3 Influência do pré-tratamento com L-arginina.....	67
4.7.4 Influência do pré-tratamento com bicuculina e faclofen.....	67
4.7.5 Influência do pré-tratamento com p-clorofenilalanina.....	70
4.7.6 Influência do pré-tratamento com toxina pertussis.....	70
4.7.7 Influência do pré-tratamento com glibenclamida	70
4.7.8 Influência da adrenalectomia	74
4.7.9 Tolerância cruzada entre as ações da morfina e do poligodial no teste da formalina.....	75
4.8 Edema de pata em camundongos.....	75
4.9 Edema de orelha em camundongos.....	79
4.10 Efeito do poligodial na pleurisia induzida pela carragenina.....	79
4.11 Efeito do poligodial no choque anafilático em camundongos sensibilizados pela ovoalbumina.....	83
4.12 Efeito do poligodial no edema alérgico em ratos sensibilizados pela ovoalbumina.....	83
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	86
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE ABREVIACÕES

AA - ácido araquidônico
 AAE - aminoácido excitatório
 AAI - aminoácido inibitório
 ADX - adrenalectomizado
 AMPA - receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
 ATP - adenosina 5'-trifosfato
 B₂ - receptor B₂ para a bradicinina
 BK - bradicinina
 C5a - proteína do sistema complemento (anafilatoxina)
 CCK - colecistocinina
 CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
 COX - sítio ciclooxigenase da prostaglandina H sintase
 CSF - fatores estimuladores de colônias
 DAG - diacilglicerol
 EH - extrato hidroalcoólico
 ET-1 - endotelina -1
 FRDE - fator relaxante derivado do endotélio
 Glu/R - receptor de glutamato ionotrópico
 Glu_mR - receptor de glutamato metabotrópico
 GABA_A - receptor gabaérgico do tipo A
 GABA_B - receptor gabaérgico do tipo B
 GRD - gânglio da raiz dorsal
 LYT - transportador de glicina
 5-HT - serotonina
 ICAM - moléculas de adesão intercelular
 i.c.v. - intracerebroventricular
 IgE - imunoglobulina E
 IL - interleucinas
 IN - inflamação neurogênica
 INF- γ - interferon gama
 i.p. - intraperitoneal
 IP₃ - trifosfato de inositol
 i.pl. intraplantar
 i.t. - intratecal
 LT - leucotrienos
 MAC-1 - molécula de adesão da família das integrinas
 MBP - proteína básica principal
 nm - nanômetro
 KA - receptor cainato
 LFA-1 - *leucocyte function associated antigen*
 L-NAME - L-N^G-nitro arginina metil ester
 L-NOARG - N^W-nitro-L-arginina
 NANC - sistema não adrenérgico, não colinérgico
 NE - norepinefrina
 NKA - neurocinina A
 NKB - neurocinina B
 NK - receptor taquicinérgico
 NMDA - receptor N-metil-aspartato
 NO - óxido nítrico
 NOS - óxido nítrico sintase
 OVO - ovoalbumina
 PAF - fator ativador de plaquetas
 PBS - solução tamponada com fosfato
 PCPA - p-clorofenilalanina

PGF_{2α} - prostaglandina F_{2α}
PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas
PG - prostaglandina
PGI₂ - prostaglandina I₂ (prostaciclina)
PGHS - prostaglandina H sintase
PLA₂ - fosfolipase A₂
PLC - fosfolipase C
PPT-A - pré-protaquinina A
RANTES - moléculas de adesão (*regulated on activation, normal T expressed and secreted*)
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
s.c. - subcutâneo
SNC - sistema nervoso central
SP - substância P
TGF-β - fator de crescimento beta
TKs - taquicininas
TNF - fator de necrose tumoral
TRP - proteína relacionada à tiroquinase
TXA₂ - tromboxano A₂
VCAM - molécula de adesão vascular
VIP - peptídeo intestinal vasoativo
VLA-4 - *very late antigen 4*
VR1 - receptor vanilóide do tipo 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Ramo lateral e flores da <i>Drymis winteri</i>	2
FIGURA 2 Estrutura molecular do composto poligodial isolado das cascas da <i>Drymis winteri</i>	32
FIGURA 3 Efeito do poligodial nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, caolim e zimosan.....	52
FIGURA 4 Perfil temporal do efeito antinociceptivo e antiedematogênico do poligodial no teste da formalina.....	53
FIGURA 5 Efeitos antinociceptivos do poligodial administrado pelas vias oral e intraperitoneal, no modelo de dor induzida pela formalina.....	56
FIGURA 6 Efeitos antinociceptivos do poligodial administrado pelas vias intracerebroventricular, intratecal e intraplantar, no modelo de dor induzida pela formalina.....	57
FIGURA 7 Efeitos antinociceptivos do poligodial administrado pelas vias oral, intraperitoneal, intracerebroventricular, intratecal e intraplantar no modelo de dor induzida pela capsaicina.....	61
FIGURA 8 Efeito do poligodial na hiperalgesia induzida pelo glutamato.....	63
FIGURA 9 Influência do pré-tratamento com naloxona sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial ou morfina na dor induzida pela formalina.....	65

FIGURA 10 Influência do pré-tratamento com prazosin e ioimbina sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial, fenilefrina ou clonidina na dor induzida pela formalina.....	66
FIGURA 11 Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial ou L-NOARG na dor induzida pela formalina.....	68
FIGURA 12 Influência do pré-tratamento com bicuculina ou faclofen sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial, muscimol ou baclofen, na dor induzida pela formalina.....	69
FIGURA 13 Influência do pré-tratamento com PCPA sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial na dor induzida pela formalina.....	71
FIGURA 14 Influência do pré-tratamento com toxina pertussis sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodial na dor induzida pela formalina.....	72
FIGURA 15 Influência do pré-tratamento com glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva produzida pelo poligodiai na dor induzida pela formalina.....	73
FIGURA 16 Desenvolvimento de tolerância cruzada entre morfina e poligodiai na dor induzida pela formalina.....	76
FIGURA 17 Efeito do poligodiai no edema de pata causado por bradicinina, carragenina e dextrana.....	77
FIGURA 18 Efeito do poligodiai no edema de pata causado por fosfolipase A ₂	78
FIGURA 19 Efeito do poligodial no edema de pata causado por prostaglandina E ₂ e substância P.....	80

FIGURA 20 Efeito do poligodial no edema de orelha causado por ácido araquidônico, capsaicina e óleo de cróton.....	81
FIGURA 21 Efeito do poligodial na primeira fase da pleurisia induzida pela carragenina.....	82
FIGURA 22 Efeito do poligodial e dexametasona no choque anafilático de animais ativamente sensibilizados pela ovoalbumina.....	84
FIGURA 23 Efeito do poligodial no edema alérgico de pata em ratos, induzido pela ovoalbumina em animais sensibilizados.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Comparação dos valores médios das DI_{50} s para as ações antinociceptivas do poligodial, morfina, aspirina e dipirona no teste da formalina em camundongos.....	55
TABELA 2 Comparação entre os valores médios das DI_{50} s para as ações antinociceptiva do poligodial, morfina e dipirona no teste da capsaicina em camundongos.....	59
TABELA 3 Efeito do tratamento com morfina ou poligodial no teste da placa quente em camundongos.....	62
TABELA 4 Efeito do poligodial em relação à performance motora dos camundongos no teste do <i>rota-rod</i>	62
TABELA 5 Efeito da adrenalectomia dos animais sobre a atividade antinociceptiva causada pelo poligodial em relação à dor induzida pela formalina	74

RESUMO

1- No presente trabalho, foram analisadas as ações antinociceptivas, antiinflamatórias e antialérgicas do poligodial, um composto sesquiterpênico extraído das cascas da *Drymis winteri*, em vários modelos de dor, de inflamação e alergia; também, foram analisados os possíveis mecanismos envolvidos nas ações do composto.

2- O poligodial, administrado pelas vias oral, intraperitoneal, intracerebroventricular, intratecal ou intraplantar, causou ação antinociceptiva de maneira dose-dependente no modelo de dor induzido pela formalina em relação à primeira (dor neurogênica) e segunda fase da dor (dor inflamatória). Nesse modelo, dependendo da via de administração, o poligodial foi 4 a 57 vezes mais potente que a aspirina e a dipirona, e cerca de 5 a 155 vezes menos potente que a morfina. No teste de dor induzido pela capsaicina, o poligodial também foi eficaz e causou antinocicepção de maneira dose-dependente, quando administrado pelas vias oral, intraperitoneal, intratecal, intracerebroventricular ou intraplantar. Dependendo da via de administração, o composto foi cerca de 4 a 53 vezes mais potente que a dipirona e duas vezes menos potente que a morfina. O poligodial, quando administrado por via intraperitoneal, inibiu de maneira dose-dependente as contorções abdominais induzidas por ácido acético, caolim e zimosan, sendo 14 a 27 vezes mais potente que o extrato hidroalcoólico obtido das cascas da *Drymis winteri*. Contudo, quando testado na placa quente, bem como no modelo de hiperalgesia induzida pelo glutamato, o poligodial não causou analgesia. Além

disso, o poligodial não interferiu na atividade locomotora dos animais no modelo do *rota-rod*, sugerindo que a atividade antinociceptiva desse composto parece não estar relacionada à depressão do sistema nervoso central ou periférico, sendo seletiva para alguns modelos de dor.

3- As ações antinociceptivas causadas pelo poligodial não foram afetadas pelo pré-tratamento dos animais com glibenclamida (bloqueador de canal de K_{ATP}), ioimbina (antagonista de adrenoceptor α_2), bicuculina e faclofen (antagonistas de receptores $GABA_A$ e $GABA_B$, respectivamente), L-arginina (precursor do óxido nítrico); no entanto, suas ações antinociceptivas foram afetadas pelo pré-tratamento com a toxina pertussis (inativador de proteína G_i/G_o), naioxona (antagonista de receptor opióide), prazosin (antagonista de adrenoceptores α_1) e PCPA (antagonista da síntese de serotonina). Além disso, o poligodial não apresentou tolerância cruzada com a morfina, após a administração crônica dessa substância, por sete dias consecutivos.

4- A adrenalectomia dos animais realizada uma semana antes não interferiu significativamente na atividade antinociceptiva do poligodial, quando analisada em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, indicando que tais ações independem da liberação dos glicocorticóides endógenos.

5- O poligodial administrado em camundongos por via intraperitoneal foi capaz de inibir de maneira dose-dependente o edema de pata induzido pela bradicinina, carragenina, dextrana, fosfolipase A_2 , prostaglandina E_2 ou

substância P. No modelo do edema de orelha em camundongos, o poligodial inibiu os edemas induzidos por ácido araquidônico, capsaicina e óleo de cróton.

6- No modelo da pleurisia induzida pela carragenina (1%), que apresenta padrão bifásico da resposta inflamatória, o poligodial inibiu significativamente a migração celular, mas não a exsudação, quando analisado 4 h após.

7- Camundongos que foram previamente sensibilizados à ovoalbumina, ao receberem poligodial 48, 24, 12 e 6 horas antes da administração de ovoalbumina (500 μ g/kg, i.v.), apresentaram significativos índices de sobrevivência ao choque anafilático, chegando a 100% de proteção quando o composto foi administrado 6 ou 12 horas antes. Por outro lado, o poligodial foi capaz de inibir de maneira dose-dependente o edema de pata induzido por ovoalbumina em animais sensibilizados.

8- Os resultados apresentados permitem sugerir que o poligodial apresenta um importante perfil de ação antinociceptiva quando administrado por via sistêmica, tópica, espinal e supra-espinal, em relação a vários modelos de nocicepção em camundongos. O mecanismo de ação antinociceptiva desse composto não está completamente esclarecido, mas parece estar relacionado a interações com o sistemas opióide e sistemas adrenérgico (α_1) e serotoninérgico, além de estar relacionado às taquicininas. Por outro lado, suas ações antinociceptivas independem de efeitos tóxicos relacionados à depressão do sistema nervoso central ou periférico. Além disso, o poligodial apresentou perfil antiinflamatório, inibindo os edemas de pata e de orelha induzidos por vários agentes, além de inibir a migração celular na cavidade pleural.

Finalmente, o poligodial demonstrou significativa atividade antialérgica em animais sensibilizados.

Os resultados aqui apresentados estendem dados previamente relatados e demonstram que o poligodial, principal constituinte isolado das cascas da planta medicinal brasileira *D. winteri*, produz antinocicepção sistêmica, local, espinhal e supra-espinhal quando testado em modelos químicos (dor induzida pela formalina e pela capsaicina), contudo não em modelos térmicos (placa quente) de nocicepção em camundongos; mostra também amplo perfil de atividade antiedematogênica e antialérgica. O mecanismo preciso pelo qual o poligodial produz suas ações antinociceptivas está atualmente sob investigação, mas uma interação com o sistema opióide, o envolvimento com receptores de serotonina e adrenérgicos α_1 , bem como interação com mecanismos dependentes de proteína G_i/G_o sensíveis ao tratamento com toxina pertussis, têm um importante papel modulatório nas suas ações antinociceptivas. Interessantes perspectivas para o aproveitamento do poligodial ou de seus derivados no desenvolvimento de novas drogas ficam estabelecidas, especialmente no tratamento da dor neurogênica, ainda sem uma terapêutica eficaz, além de perspectivas do uso da substância como antiinflamatório e antialérgico. No entanto, novos estudos far-se-ão necessários, visando especialmente dirimir dúvidas quanto ao mecanismo de ação e potencial toxicológico do composto.

ABSTRACT

1- In this study, the antinociceptive, antiinflammatory and anti-allergic actions of the polygodial were analyzed, a compound extracted from the bark of *Drymis winteri*, in several pain, inflammatory and allergy models. In addition, we have analyzed the possible mechanisms involved in the actions of this compound.

2- The polygodial, administered by oral, intraperitoneal, intracerebroventricular, intrathecal or intraplantar routes, caused antinociceptive action in a dose-dependent manner in the pain model induced by the formalin in relation to the first (neurogenic pain) and second phase (inflammatory pain) of the pain. In this model, polygodial was about 4 to 57-fold more potent than aspirin and dypirone, but it was about 2 to 155-fold less potent than morphine, depending on the route of administration used. In the pain test induced by the capsaicin, the polygodial was also caused dose-dependent antinociception when it was administered by oral, intraperitoneal, intrathecal, intracerebroventricular or intraplantar routes. In this model, polygodial was about 4 to 53 fold-more potent than dypirone, but it was about 2-fold less potent than morphine, depending on the route of administration used. The polygodial used by intraperitoneal route was able, dose-dependently to inhibit the abdominal constrictions induced by acetic acid, kaolin or zymosan, being 14-fold more potent than the hydroalcoholic extract of *D. winteri*. Also, when submitted to the hot plate test, the polygodial did not cause analgesia. Moreover, in the hyperalgesia model induced by glutamate, the polygodial did not cause any effect. In addition, the

polygodial did not interfere with the motor performance of the animals in the rota-rod model, suggesting that its antinociceptive activity is not related with the depression of the central or peripheral nervous system and that it is selective for some models of pain.

3- The antinociceptive actions caused by the polygodial were not affected by pre-treatment with glibenclamide (a K_{ATP} channel blocker), yohimbine (α_2 -adrenoreceptor antagonist), bicuculline and phaclofen ($GABA_A$ and $GABA_B$ receptor antagonists), or L-arginine (a nitric oxide precursor). However, the antinociceptive actions were affected by pre-treatment with pertussis toxin (an inactivator of G_i/G_o protein), naloxone (an antagonist of opioid receptor), prazosin (α_1 -adrenoreceptor antagonist) or PCPA (an inhibitor of serotonin synthesis). Also, unlike the case of morphine, the animals did not develop tolerance to the polygodial when they received it for seven days, in succession.

4- The bilateral adrenalectomy of animals 7 days before, did not interfere significantly with the analgesic activity of the polygodial, in relation to either phase of the pain induced by formalin, indicating that such actions are not modulated by endogenous glucocorticoids.

5- The polygodial administered by intraperitoneal route was able to inhibit, in a dose-dependent manner the paw-oedema induced by bradykinin, carrageenan, dextran, phospholipase A_2 , prostaglandin E_2 or substance P. In the model of ear-oedema, it was also capable of inhibiting the oedemas induced by arachidonic acid, capsaicin and croton oil.

6- In the pleurisy induced by the carrageen (1%), which presents a two-phase pattern of the inflammatory response, the polygodial significantly inhibited the cellular migration, but not the exudation.

7- Animals that had been sensitized previously to ovalbumine, when they received polygodial 48, 24, 12 and 6 hours before the administration of ovalbumine (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), presented significant survival indexes in relation to anaphylactic shock, reaching 100% when the compound was administered before 6 or 12 hours. Also, polygodial was able to inhibit, in a dose-dependent manner, the paw-oedema induced by ovalbumine in the animals sensitized.

8- The results presented above, allow us to suggest that the polygodial presents an important profile of antinociceptive action through several routes of administration, in relation to several models of nociception in mice. The mechanism of the antinociceptive action of this compound is not completely clear, but it seems to be related to interactions with the opioid system and to the adrenergic (α_1) and serotonergic systems, besides being related to the tachykinins. Moreover, its antinociceptive actions are unlikely to involve toxic effects related to the depression of the central and peripheral nervous system. In addition, the polygodial presented an antiinflammatory profile, inhibiting the paw and ear oedemas induced by several agents, besides inhibiting the cellular migration to the pleural level. Finally, the polygodial demonstrated significant anti-allergic activity, justifying at least partly, its folk-medicinal use in the treatment of respiratory diseases.

The results here presented, extending previously-established data, show that polygodial, the main compound isolated from bark of the Brazilian medicinal plant *Drymis winteri*, produces systemic, local, spinal and supraspinal antinociception when tested in chemical models (formalin and capsaicin-induced) but not in nociception thermal (hot plate) models of pain in mice, besides demonstrating a wide profile of antioedematogenic and anti-allergic activities. The precise mechanism by which the polygodial produces its antinociceptive actions is now under investigation, but an interaction with the opioid system, involvement with serotonergic and adrenergic receptors (α_1) as well as an interaction with mechanisms dependent of G_i/G_o proteins sensitive to the treatment with pertussis toxin, has an important modulatory role in its antinociceptive actions. Interesting perspectives for the use of the compound or its derivatives in the development of new drugs had been established, especially in the treatment of neurogenic pain, still without an effective therapy. Also perspectives now exist for the use of the substance as antiinflammatory and anti-allergic drug. However, further studies are necessary, especially in relation to the clearing up of doubts regarding the exact mechanism of action and toxicological potential of this compound.

1 - INTRODUÇÃO

Nossos estudos avaliaram os efeitos antinociceptivos, antiinflamatórios e antialérgicos do poligodial, um sesquiterpeno obtido das cascas da *Drymis winteri*. A *D. winteri* pertence à família das *Winteraceae*; tem até 5 metros de altura; folhas dispostas em ordem alternada, alongadas e de extremidades arredondadas, de aproximadamente 6 a 7 cm de comprimento e 6 cm de largura, apresentando ainda a face inferior branco-prateada. É uma planta nativa do Sul do Brasil e de alguns outros países da América do Sul. Suas flores são hermafroditas, com 2 a 3 cm de diâmetro, pétalas brancas, muitos estames e fruto carnosos (Figura 1). A medicina popular recomenda a infusão de suas cascas ou folhas para o tratamento de diferentes doenças inflamatórias, tais como asma, alergia e bronquite. Essa planta é também usada como antiespasmódica, antipirética e cicatrizante (Morton, 1981; Simões *et al.*, 1986) e no tratamento do câncer e úlceras (Ricciari, 1981; Houghton e Mamby, 1985; Gupta, 1995; Graves, 1996).

Estudos desenvolvidos em nossos laboratórios (El Sayah, 1996) mostraram que o extrato hidroalcoólico (EH) da *D. winteri* causou antagonismo do tipo não competitivo no íleo isolado de cobaia para as curvas concentração-respostas induzidas pela acetilcolina, histamina e bradicinina (BK). Esse mesmo perfil foi observado no útero isolado de rata para a acetilcolina, BK, prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), endotelina-1 (ET-1) e angiotensina II, além de ter



Figura 1 - Vista de um dos ramos laterais, com flores, da *Drymis winteri*.

causado deslocamento à direita da curva contrátil concentração-resposta ao CaCl_2 . Por outro lado, na bexiga isolada de cobaia, o EH não interferiu na resposta contrátil induzida pelo carbacol, porém causou deslocamento parcial da curva concentração-resposta induzida pela histamina, e inibiu significativamente a resposta contrátil à BK e à substância P (SP) (El Sayah, 1996). Já, na traquéia isolada de cobaia, o extrato inibiu de forma significativa a resposta contrátil induzida pela BK e à prostaglandina E_2 (PGE_2) e antagonizou, de maneira aparentemente competitiva, a resposta contrátil induzida pelo análogo estável do tromboxano A_2 (TXA_2), o U 46619, pelo composto 48/80, pela substância P e pelo agonista seletivo do tipo NK_2 , o $[\beta\text{-ala}^8]$ neurocinina A (4-10). No entanto, o EH não interferiu na contração induzida pelo agonista seletivo do tipo NK_1 , a substância P - metil ester, porém causou inibição parcial á capsaicina. Ainda na traquéia de cobaia, o EH causou deslocamento parcial á direita para a histamina, sem afetar, contudo, a contração induzida pela acetilcolina. Por outro lado, na traquéia de animais sensibilizados á ovoalbumina (OVO), o EH causou significativa inibição de forma concentração e tempo-dependentes da resposta contrátil induzida pelo antígeno (El Sayah, *et al.*, 1997). Quando o EH foi testado na veia porta isolada de rato, observou-se inibição significativa da resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo do receptor NK_3 , o senktide (El Sayah, 1996).

Um composto sesquiterpeno isolado da *D. winteri*, identificado como poligodial (Figura 2), também foi testado em nossos laboratórios (El Sayah, *et al.*, 1998). No íleo isolado de cobaia, o poligodial causou deslocamento à direita

da curva concentração-resposta à acetilcolina, histamina e à BK, associado com a inibição das respostas máximas. Já, na traquéia de cobaia, o poligodial causou inibição parcial da resposta contrátil à histamina e inibiu a curva concentração-resposta à BK. Por outro lado, o poligodial inibiu de forma significativa e concentração-dependente a resposta contrátil induzida pelo composto 48/80 e pelo análogo estável do TXA₂ o U 46619. Além disso, o poligodial, como descrito para o extrato total da *D. winteri*, antagonizou de maneira aparentemente competitiva a resposta contrátil à SP, mas não interferiu na resposta contrátil ao agonista seletivo do receptor NK₁, a substância P metil-éster; também inibiu significativamente a curva concentração-resposta induzida pelo agonista seletivo do receptor NK₂, o [β -ala⁸] neurocinina A (4-10). Já, na traquéia obtida de cobaias ativamente sensibilizadas á OVO, o poligodial causou inibição significativa da resposta contrátil ao antígeno (El Sayah, *et al.*, 1998). O poligodial também foi testado na veia porta isolada de rato, tendo causado significativa inibição da curva concentração-resposta induzida pela BK, U 46619, ET-1, SP e ao senktide (El Sayah, 1996).

Outros estudos desenvolvidos em nossos laboratórios (Tratsk *et al.*, 1998), dessa vez *in vivo*, demonstraram que o extrato de *D. winteri*, administrado por via oral (30 a 100 mg/kg) uma hora antes, inibiu de maneira dose e tempo-dependentes o edema de pata em ratos, induzido por carragenina (300 μ g/pata). A inibição do edema persistiu mesmo quando o extrato foi administrado duas e quatro horas antes. O EH inibiu também o edema de pata induzido por dextrana (100 μ g/pata), entretanto esse efeito não foi dose-

dependente. Ao contrário, o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (12 µg/pata) não foi inibido pelo tratamento. Por outro lado, o tratamento dos animais com EH inibiu significativamente o edema de pata em ratos induzido por vários mediadores da inflamação, tais como a BK (3 nmol/pata), a SP (10 nmol/pata) e pelo fator ativador de plaquetas (PAF) (10 nmol/pata).

Os mesmos autores (Tratsk, *et al.*, 1998) demonstraram ainda que, em animais adrenalectomizados bilateralmente uma semana antes, o edema de pata causado pela BK (3 nmol/pata) foi inibido pelo EH de *D. winteri*; entretanto, a inibição causada pelo EH foi significativamente reduzida quando comparada com a resposta obtida nos animais controle. Além disso, em ratos ativamente sensibilizados com OVO, o edema de pata causado pela injeção intraplantar do antígeno foi significativamente inibido pelo EH (30 a 100 mg/kg, p.o), ao passo que camundongos sensibilizados por OVO, quando submetidos ao choque anafilático (OVO, 500 µg/kg, i.v.), tiveram um aumento significativo na taxa de sobrevivência. O efeito protetor causado pelo extrato foi de longa duração e, mesmo quando administrado 15 h antes da indução do choque, mostrou uma proteção em torno de 70%.

Finalmente, Mendes *et al.* (1998), utilizando o EH (10 a 60 mg/kg, i.p. e 100 a 400 mg/kg, p. o.) administrado quatro horas antes, demonstraram que ele produz inibição significativa das contorções abdominais causadas pelas injeções de ácido acético (0,6%), de suspensão de zimosan (40 mg/kg) e de suspensão de caolim (50 mg/kg). Além disso, o extrato, nas mesmas doses e vias, produziu inibição dose-dependente de ambas as fases da dor induzida

pela formalina, bem como inibiu significativamente a dor neurogênica induzida pela capsaicina. O EH foi capaz também de reverter de maneira gradual a hiperalgesia induzida pela BK (3 nmol/pata), ou pela SP (10 nmol/pata), na pata de ratos; não afetou, porém, a hiperalgesia induzida pela carragenina ou pela PGE₂. Quando o extrato foi analisado na placa quente, mostrou-se inativo. Ao contrário dos estudos realizados no edema de pata, o efeito antinociceptivo do extrato não foi modificado pela adrenalectomia prévia dos animais, indicando, nesse caso, que suas ações antinociceptivas não parecem depender de uma interação com glicocorticóides endógenos. Por último, o efeito antinociceptivo do EH foi significativamente revertido pelo tratamento prévio dos animais com a naloxona, quando testado no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, evidenciando o envolvimento, pelo menos em parte, com o sistema opióide, através de um mecanismo sensível à naloxona (Mendes, *et al.*, 1998).

Neutransmissão central da dor

As vias aferentes envolvidas na transmissão da informação nociceptiva, de uma área inflamada para os centros superiores, passam pela raiz medular dorsal, sistema de controle de dor por comporta (*gate-control*), tratos ascendentes e tálamo, sendo o componente sensorial da nocicepção projetado para o córtex somatosensorial onde é processado. O componente emocional afetivo e avaliativo da nocicepção compreende uma projeção difusa do tálamo

para o córtex, em particular o córtex pré-frontal e sistema límbico, que contém receptores opióides (Walton *et al.*, 1994).

A via descendente inibitória da dor passa via funículo dorsolateral. Essa via inicia na área cinzenta periaquedutal e recebe impulsos do hipotálamo e do trato espinotalâmico ascendente; descende via núcleo da rafe, que dá origem a neurônios liberadores de serotonina (5-HT) e de norepinefrina (NE), cujos papéis inibitórios descendentes contribuem para a analgesia. Além disso, o sistema descendente do tronco cerebral para a raiz dorsal da medula espinhal tem sido implicado na produção de analgesia. As terminações dessas fibras fazem sinapse com neurônios encefalinérgicos na raiz dorsal, completando um longo *feedback* e uma parte essencial no sistema de controle de dor por comporta. A via descendente do córtex pré-frontal, via hipotálamo para a área cinzenta periaquedutal, permite que processos corticais sejam capazes de modificar a apreciação da dor (Walton *et al.*, 1994; Dickenson, 1995; Stamford, 1995).

Os nociceptores são terminações nervosas livres que respondem a estimulações diretas ou, ainda, através de substâncias químicas liberadas localmente. Com base em critério funcional, os nociceptores podem ser classificados em: 1) Nociceptores mecanosensitivos e nociceptores mecanotérmicos com fibras A δ , com velocidade de condução de 5 - 10 m/s, ativados por estímulos tácteis, térmicos e sonoros; 2) Nociceptores polimodais com fibras C, com velocidade de condução de 0,5 - 2 m/s, ativados por

estímulos mecânicos, químicos, térmicos e substâncias liberadas durante a inflamação (Walton, *et al.*, 1994; Noback *et al.*, 1996; Almeida, 1996).

Em determinadas circunstâncias, para um estímulo que é normalmente doloroso, existe uma resposta aumentada. O estado de sensibilização desenvolvido nessas circunstâncias é conhecido como hiperalgesia, que é caracterizada principalmente por uma redução no limiar nociceptivo e maior sensibilidade a estímulos supralimiais (Noback *et al.*, 1996). A hiperalgesia envolve mediadores armazenados (SP e aminoácidos excitatórios) e induzidos (óxido nítrico e metabólitos derivados do ácido araquidônico), liberados de neurônios aferentes primários ou sintetizados na medula espinhal (Meller e Gebhart, 1994; Meller *et al.*, 1994; Meller *et al.*, 1996).

Distinta da hiperalgesia é a alodinia que, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, é conceituada como sendo dor devida a estímulo que normalmente não provoca dor. Minami *et al.* (1995) relataram recentemente que a administração intratecal (i.t.) de PGE₂ ou PGF_{2α} em camundongos induz alodinia através da via que inclui os receptores glutamatérgicos, pois a alodinia induzida foi bloqueada por antagonistas de receptores N-metil-aspartato (NMDA) e de glutamato metabotrópicos (GluM_R). Os autores demonstraram também que a alodinia induzida pela PGE₂ é mediada através de sistema gerador de óxido nítrico (NO); ainda, que a alodinia induzida pela PGF_{2α} pode ser mediada por interações com o sistema NO em sítios diferentes daqueles geradores de NO na medula espinhal. Por outro lado, a injeção espinhal de baclofen, um agonista de receptores gabaérgicos do tipo B

(GABA_B), ou muscimol, um agonista de receptores gabaérgicos do tipo A (GABA_A), resultaram em antagonismo dose-dependente da alodinia produzida em ratos por ligadura de raízes nervosas ou por cateterismo intratecal lombar crônico. Isso indica que o sistema espinhal de receptores GABA_{A/B} modula os sistemas espinhais ativados por mecanorreceptores de baixo limiar que medeiam a alodinia observada, seguindo uma lesão nervosa periférica (Hwang e Yaksh, 1997).

No sistema nervoso central (SNC), várias substâncias estão envolvidas como neurotransmissores da dor, e entre essas, o glutamato. O glutamato é o principal aminoácido excitatório (AAE) do SNC, sendo sintetizado pela deaminação da glutamina, ou através do ciclo do ácido tricarboxílico e liberado para a fenda sináptica em resposta à despolarização do terminal nervoso pré-sináptico, num processo dependente de Ca²⁺ regulado por múltiplos tipos de canais de Ca²⁺, dos quais, provavelmente, os mais importantes são os canais N e P. Os neurônios e sinapses para os AAE estão concentrados particularmente no hipocampo, nas camadas externas do córtex cerebral e na substância gelatinosa da medula espinhal. Nessas camadas os AAE desempenham papel importante nos processos fisiológicos, como, por exemplo, na aprendizagem e na memória, nos mecanismos de transdução dolorosa, em processos patológicos, tais como dano excitotóxico neuronal que se segue a trauma ou isquemia central e na sensibilização central e transdução espinhal da dor em resposta aos danos teciduais periféricos (para revisão ver Hudspith, 1997).

Dois principais grupos de receptores para AAE têm sido identificados: receptores de glutamato ionotrópicos (Glu/R) (canais iônicos operados por ligantes), cuja família de receptores pode ser classificada farmacologicamente, de acordo com a ativação por agonistas específicos, em três subtipos: receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), receptores kainato (KA) e receptores NMDA (Hudspith, 1997; Kaczmarek *et al.*, 1997) e, ainda, os receptores de glutamato metabotrópicos (GlumR) (ligados à proteína G), que modulam segundos mensageiros intracelulares, tais como fosfatos de inositol e nucleotídeos cíclicos. Até o momento, oito subtipos de receptores GlumR foram identificados através de técnicas de biologia molecular (Conn e Pinn, 1997). Existem evidências de que os receptores NMDA estão envolvidos na ação atenuante da antinocicepção da morfina pela L-arginina (Bhargava *et al.*, 1998). Além disso, o uso de anticorpos anti-GlumR em ratos sugere a participação desses receptores no processamento nociceptivo da dor crônica, além da sinalização para estímulos nocivos agudos (Fundytus *et al.*, 1998).

Entre os aminoácidos inibitórios endógenos (AAI), importantes neurotransmissores no cérebro/tronco encefálico e medula espinhal, o GABA provavelmente atua como um importante inibidor pós-sináptico dos corpos celulares de neurônios de segunda ordem na substância gelatinosa, bloqueando a progressão da transmissão da informação nociceptiva para o cérebro (Duggan e Foong, 1985)

A classificação dos receptores GABA ($GABA_{A/B}$), introduzida em 1981, define os receptores $GABA_A$ como sendo sensíveis ao antagonismo pela

bicuculina e insensíveis à ativação pelo baclofen; os receptores GABA_B, por sua vez, são insensíveis ao antagonismo pela bicuculina, sendo ativados pelo baclofen (Hill e Bowery, 1981; Bowery, 1993). Os receptores GABA_A são receptores ionotrópicos e induzem aumento da condutância de íon Cl⁻. Além dos agonistas e antagonistas competitivos e não competitivos capazes de atuar nos receptores GABA_A, esses podem ser modulados alostericamente por um número muito grande de substâncias, incluindo barbitúricos, benzodiazepínicos, etanol, corticosteróides, anestésicos e inseticidas (para revisão ver Johnston, 1996). Os receptores GABA_B são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e ligados a sistemas de segundos mensageiros. Em muitas regiões do cérebro, a ativação de receptores GABA_B resulta em aumento da condutância dos canais de K⁺, com resultante hiperpolarização da membrana neuronal.

A glicina é o principal neurotransmissor inibitório no tronco encefálico e medula espinhal, onde participa de funções motoras e sensoriais. Está também presente no prosencéfalo onde tem sido demonstrada sua função como coagonista do subtipo de receptor NMDA. A glicina é liberada das terminações nervosas de uma forma dependente de Ca²⁺, sendo posteriormente, recaptada via transportadores de glicina (para revisão ver Paul, 1995). Dois transportadores de glicina foram clonados, tendo sido encontrados no SNC e em vários tecidos periféricos, denominados GLYT-1 e GLYT-2 (Borowsky *et al.*, 1993). A glicina ativa a condutância do íon Cl⁻, resultando na hiperpolarização da membrana neuronal e num antagonismo de outros estímulos despolarizantes (Betz, 1992). O receptor de glicina é um pentâmero de subunidades homólogas

48 kDa (α) e 58 kDa (β), que forma um canal intrínseco de Cl^- . Quatro isoformas expressas diferentemente da subunidade- α (α_1 - α_4) e uma variedade da subunidade- β (β_1) têm sido identificadas através de clonagem. A subunidade- α se comporta como sítio de ligação, enquanto que a subunidade- β é o principal determinante da condutância do canal (para revisões ver Paul, 1995; Kuhse *et al.*, 1995).

Entre os neuropeptídeos, os peptídeos opióides atuam através de pelo menos três principais classes de receptores: μ (mu), δ (delta) e κ (kappa), cada um deles contendo possíveis subtipos de receptores (Connel *et al.*, 1994; Chien e Pasternack, 1994). Dentro da família opióide, alguns receptores foram clonados: o clone DOR-1 codifica receptores δ , enquanto os clones MOR-1 e KOR-1 codificam receptores μ e κ_1 ; um quarto membro da família dos receptores opióides, KOR-3 ou ORL-1, também foi clonado. A descoberta dos receptores opióides levou à identificação, no cérebro, de uma ampla variedade de peptídeos com atividade opióide, incluindo encefalinas, endorfinas, dinorfinas, endomorfina e nociceptina (para revisão ver Standifer e Pasternak, 1997).

As encefalinas foram, originariamente, identificadas em extratos de cérebro de porcos por Hughes *et al.* (1975). Dois peptídeos estruturalmente semelhantes foram encontrados - metionina encefalina e leucina encefalina - cada qual derivado da clivagem do precursor pró-encefalina A. Esses peptídeos têm propriedades em comum com a morfina, tais como a produção de analgesia, dependência física e tolerância e contração da musculatura lisa; suas ações são revertidas ou bloqueadas pelo antagonista opióide naioxona. As

variações regionais nos níveis de encefalinas correspondem à distribuição dos receptores opióides (Akil *et al.*, 1984).

As endorfinas correspondem a pelo menos quatro peptídeos, designados α -, β -, γ -, e δ -endorfinas (a β -endorfina é a mais importante), todas derivadas da clivagem enzimática do precursor pró-opiomelanocortina. As endorfinas são encontradas principalmente na glândula pituitária anterior, nas mesmas células que contém corticotrofina e β -lipotropina.

A substância P (SP) é um polipeptídeo descoberto por Von Euler e Gaddum (1931), sendo um importante neurotransmissor em fibras nervosas de pequeno diâmetro, particularmente nas fibras C. A SP é encontrada em várias áreas relacionadas à dor, como nos corpos celulares do gânglio da raiz dorsal e projeções para a substância gelatinosa espinhal, na divisão caudal do núcleo espinhal trigeminal, nos núcleos pálido e magno da rafe e na área cinzenta periaquedutal. A SP é liberada das terminações nervosas e estocada em grânulos de neurônios sensoriais. Os aminoácidos básicos da extremidade N-terminal da molécula de SP estão envolvidos na vasodilatação causada por essa substância. A SP também desempenha seu papel pró-inflamatório através da indução do aumento da permeabilidade vascular, com o extravasamento de plasma e conseqüente formação de edema. Este efeito é atribuído à porção C-terminal da molécula. Estudos recentes (DeFelipe *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1998) demonstraram que modificações genéticas que levem à falta, em camundongos, de receptor para a substância P (NK-1) alteram as respostas nociceptivas, analgésicas e a agressividade desses animais. Por outro lado, modificações no

gene pré-prótaquicinina A (PPT-A), que codifica a substância P e a neurocinina A, praticamente abolem a inflamação neurogênica nos animais mutantes, além de redução significativa das respostas à dor. Os nervos envolvidos nas ações da SP são aferentes, de pequeno diâmetro, polimodais não-mielinizados, sendo importantes para transmissão central da informação nociceptiva, quando a substância P é liberada do trato espinhal mediante estimulação ortodrômica em resposta ao estímulo nocivo e para a liberação da substância P e de outros neuropeptídeos de terminações nervosas colaterais e tecidos periféricos, seguindo estimulação nociva antidrômica e resultando em inflamação neurogênica (Geppetti *et al.*, 1995).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) está localizado juntamente com a SP em muitos neurônios sensoriais em órgãos e tecidos dentre os quais a pele (Gibbins *et al.*, 1987a, b). O CGRP é um potente peptídeo vasodilatador encontrado em várias espécies, inclusive no homem. Em humanos e em animais, a injeção intradérmica de CGRP causa aumento prolongado no fluxo sanguíneo local (Brain e Williams, 1985), potencializando o edema induzido por mediadores que promovem o aumento da permeabilidade microvascular, incluindo a SP e as neurocininas (Brain e Williams, 1985; Hughes e Brain, 1991). O CGRP é liberado por neurônios sensíveis à capsaicina, que liberam também glutamato e somatostatina (Dray, 1992).

A inflamação

A primeira fase da resposta inflamatória é caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo na área lesada, em consequência de dilatação e engurgitamento dos capilares e arteríolas, bem como do recrutamento adicional de outros vasos que normalmente estão hipofuncionantes, levando ao eritema ou ao rubor da área comprometida; também pode haver elevação da temperatura local (Rocha e Silva, 1978; Sedgwick e Willoughby, 1985; 1989). A vasodilatação se deve à ação de mediadores em nível arteriolar e venular, entre eles, as cininas, histamina, 5-HT, leucotrienos (LTs), PAF-acéter, quinto componente do sistema complemento (C5a), prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicininas e CGRP) (Hua, 1986; Haanen e Vermes, 1995; Saleh, 1996). O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores, o que amplifica a resposta inflamatória. A segunda fase da resposta inflamatória é caracterizada pela migração de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da lesão (quimiotaxia). Além da geração plasmática ou no sítio da lesão de fatores quimiotáticos, ocorrem mudanças na distribuição dos componentes celulares em relação ao fluxo sanguíneo (Cotran *et al.*, 1991). Os leucócitos, que normalmente circulam no centro da luz vascular, passam a ser detectados nas proximidades da parede do vaso, processo que é denominado de marginação leucocitária. Além disso, a migração celular é facilitada pelas moléculas de adesão expressas em diferentes tipos de células por estímulos gerados no sítio do processo inflamatório, as quais têm sido identificadas em leucócitos,

macrófagos, fibroblastos, plaquetas, bem como em células endoteliais (Bevilacqua, 1993). Os fatores quimiotáticos estimulam tanto os leucócitos como as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, facilitando a adesividade entre essas células, processo conhecido como *rolling*. A adesão posterior dos granulócitos á parede do endotélio facilita a sua migração ao foco da lesão (Bevilacqua, 1993; Frenette e Wagner, 1996).

A resposta celular decorrente do dano tecidual depende do tipo, da duração e da severidade da lesão, bem como do modelo de interação celular e do estado imunológico do hospedeiro (Cotran *et al.*, 1991). Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) são ativamente fagocíticos, e a energia para esse processo é derivada da via glicolítica (Davies e Hagen, 1997). Os leucócitos mononucleares podem migrar preferencialmente para o local da lesão (Sibille e Reynolds, 1990), onde são ativados por produtos liberados principalmente pelos macrófagos, passando a sintetizar e liberar um grande número de agentes, incluindo citocinas e produtos da via do ácido araquidônico (AA), além de outros mediadores. Os eosinófilos também estão envolvidos nesse processo e, quando ativados pelo PAF-acéter, por exemplo, liberam mediadores lipídicos bioativos e derivados do AA, entre outros, bem como as chamadas proteínas básicas (MBP-Proteína Básica Maior, ECP-Proteína Eosinofílica Catiônica, EPO-Peroxidase Eosinofílica, EPX-Proteína X Eosinofílica e EDN-Neurotoxina Derivada do Eosinófilo). Estudos têm demonstrado que a MBP, ECP e EPO induzem a uma liberação não citolítica da

histamina tanto em basófilos como em mastócitos (Bainton, 1992; Ferguson *et al.*, 1995; Kita *et al.*, 1995).

Também tem sido demonstrado que os macrófagos residentes ou monócitos (que se originam da mesma célula na medula óssea ou a partir de outros tecidos) participam ativamente do processo inflamatório. Os macrófagos exercem a função de limpeza do organismo, removendo células sangüíneas defeituosas ou estimulando o sistema imunológico na defesa contra agentes estranhos. Os monócitos são recrutados para o sítio do processo inflamatório através de fatores quimiotáticos gerados localmente e também por proteínas catiônicas liberadas dos grânulos de neutrófilos (Cramer, 1992; Galli, 1993). Na terceira fase da resposta inflamatória, ocorre regeneração tecidual ou fibrose.

Mediadores químicos periféricos da dor e da inflamação

No grupo das cininas, a BK, sua principal representante, é peptídeo composto de nove aminoácidos, formado no plasma a partir da degradação do cininogênio, por ação de enzimas proteolíticas conhecidas como calicreínas (Hall, 1992; Dray e Perkins, 1993; Carretero e Scicli, 1991). O sistema das calicreínas pode ser ativado por anóxia, inflamação, redução do pH ou trauma tecidual (Bathon e Proud, 1991). As cininas formadas (BK e calidina) participam de diversos processos fisiopatológicos, como a regulação da pressão arterial, controle de tônus de musculatura lisa no trato gastrintestinal e das vias aéreas, bem como em vários estados relacionados com a inflamação e a produção do fenômeno doloroso (Hall, 1992; Hess, 1997; Griesbacher e Legat, 1997). Os

níveis plasmáticos de BK e de seus principais metabólitos, a des-Arg⁹-BK e a des-Arg¹⁰-LBK, estão aumentados em vários processos inflamatórios (Regoli e Barabé, 1980; Hargreaves *et al.*, 1988; Damas *et al.*, 1990). A injeção de BK produz dor pela ativação e/ou sensibilização de fibras aferentes nociceptivas do tipo A δ e C (Collier e Lee, 1963; Szolcsányi, 1987). Pode, ainda, modular a neurotransmissão autonômica para alguns transmissores em vários músculos lisos, atuando tanto através de receptores B₂ como B₁ (Acevedo *et al.*, 1990; Llona *et al.*, 1991; Maas *et al.*, 1995).

Os receptores das cininas classificam-se em receptores B₁ e B₂ (Regoli e Barabé, 1980; McErchern *et al.*, 1991; MacNeil *et al.*, 1995; Hess, 1994;1997; Hall, 1997). Os receptores B₁ mostram uma preferência pelo metabólito ativo da BK, a des-Arg⁹-BK (Regoli e Barabe, 1994; Bouthillier *et al.*, 1987). Sua expressão pode ser induzida em certas ocasiões, como, por exemplo, após trauma tecidual ou durante processos inflamatórios crônicos (Marceau, 1995,1997; Donaldson *et al.*, 1997).

A maioria das ações da BK, incluindo a ativação aguda de nociceptores e a produção de dor, são mediadas através da ativação de receptores B₂. Esses receptores são constitutivos, amplamente distribuídos no organismo, em vários órgãos periféricamente, bem como no sistema nervoso central de várias espécies (Hall, 1992). Ao contrário dos receptores B₁, os do tipo B₂ apresentam grande afinidade á BK e á L-BK.

As cininas aumentam a permeabilidade do endotélio vascular para fluidos e proteínas plasmáticas, resultando em edema. Tais respostas envolvem

receptores B_2 (Whalley, 1987; Cirino *et al.*, 1991). As cininas são bem conhecidas por estimularem aferentes primários, o que resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo as taquicininas (TKs) e o CGRP. Em conjunto, esses vários efeitos amplificam o processo inflamatório.

Outro grupo importante dentre os mediadores da inflamação pertence à família das citocinas e consiste em interleucinas (IL) ou quimiocinas, fatores de necrose tumoral (TNF), fatores estimuladores de colônias (CSF), interferons (IFN), fatores de crescimento e fatores supressores (Luger e Schwarz, 1995). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, o TNF- α e a IL-6, são produzidos em doenças inflamatórias, principalmente a partir de monócitos/macrófagos.

Dois diferentes tipos de IL-1, denominadas α e β , têm sido descritas, apresentando um amplo espectro de atividades biológicas, porém atuando através de receptores comuns. A IL-1 é um importante mediador inflamatório que induz a febre, a produção de proteínas de fase aguda; causa infiltrado inflamatório quando injetada na pele (Dinarello, 1989) e estimula as células endoteliais que produzem citocinas e expressam moléculas de superfície, tais como moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), e moléculas de adesão endotelial (ELAM-1) (Cork e Duff, 1993). A IL-6 é uma citocina liberada por quase todas as células mediante estimulação apropriada. O TNF- α é secretado por várias células tendo um amplo espectro de atividades biológicas. As quimiocinas têm sido classificadas em quimiocinas CXC, responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos; quimiocinas CC, responsáveis pela atração de

monócitos e linfócitos, e a linfotactina (quimiocina C), que recruta primariamente linfócitos (Schröder *et al.*, 1993; Schiuger e Rom, 1997).

Entre os eicosanóides, os principais são as prostaglandinas, a prostaciclina (PGI_2), o TXA_2 e os LTs. As prostaglandinas da série E estão particularmente associadas à produção de dor que acompanha trauma e infecção. O ácido araquidônico (AA) é parte integrante dos fosfolipídeos da membrana celular. Durante a estimulação celular, a liberação de AA é catalisada por várias vias enzimáticas diretas e indiretas; a via direta envolve a estimulação de fosfolipase A_2 (PLA_2); nas vias indiretas, uma requer a ativação de fosfolipase C (PLC), que resulta na formação de segundos mensageiros da via do trifosfato de inositol (IP_3) e do diacilglicerol (DAG), e a outra libera AA, via uma lisofosfolipase precedida por PLA_2 (Wolfe e Harrocks, 1994).

Na via da ciclooxigenase, o AA é convertido para prostanóides, incluindo PGs, PGI_2 e TXA_2 . Tal conversão é catalisada pela enzima prostaglandina H sintase (PGHS). A PGHS é uma enzima bifuncional, que tem um sítio ciclooxigenase (COX), o qual cicliza o AA e adiciona o grupo 15-hidroperoxi para formar prostaglandina G_2 (PGG_2); também contém um sítio peroxidase que reduz o grupo hidroperoxi para um grupo hidroxil para formar PGH_2 , que é convertida para uma das várias prostaglandinas. Os prostanóides (principalmente PGE_2) são importantes mediadores da inflamação (Pairet e Engelhardt, 1996). As PGs e PGIs sensibilizam as terminações nervosas para as ações da histamina e da BK (Walton *et al.*, 1994).

Existem duas isoformas de PGHS, uma forma constitutiva (COX-1) e uma forma induzida (COX-2). Em condições fisiológicas, a atividade da COX-1 predomina; a expressão de COX-2 pode ser induzida por estímulos inflamatórios e mitógenos em muitos tipos de células envolvidas na inflamação (Loll e Garavito, 1994; Insel, 1996; Pairet e Engelhardt, 1996). Tem sido proposto que a COX-2 é o alvo relevante para a terapêutica com antiinflamatórios, enquanto a inibição de COX-1 é responsável pelos efeitos colaterais gástricos, renais e sangüíneos desses agentes (Battistini, *et al.*, 1994; Vane e Botting, 1996; Pairet e Engelhardt, 1996).

A via da lipooxigenase é responsável pela conversão do AA em derivados hidroperóxidos (HPETE): 12-HPETE, nas plaquetas, e 5-HPETE e 15-HPETE, nos leucócitos. O 5-HPETE sofre peroxidação e transforma-se em HETE, conhecido como quimiotático para neutrófilos. Nos mamíferos, os principais produtos metabólitos formados por essa via, são: LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. É reconhecido que o LTB₄ é um agente quimiotático potente que promove agregação de leucócitos ao endotélio venular, enquanto o LTC₄, o LTD₄ e o LTE₄ causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (Wolfe e Harrocks, 1994).

O óxido nítrico vem sendo descrito cada vez mais como molécula importante na nocicepção. As funções biológicas conhecidas para o NO podem ser divididas em duas categorias: primeiro, ele atua como uma molécula mensageira intercelular, regulando o tono vascular, a ativação plaquetária e respostas imunes, servindo como um neurotransmissor no cérebro e na periferia

de alguns dos chamados nervos NANC (não adrenérgicos, não colinérgicos); secundariamente, o NO sintetizado em grandes quantidades por macrófagos ativados é uma molécula citotóxica capaz de matar bactérias, vírus e protozoários, como também células tumorais (Moilanen e Vapaatalo, 1995).

Três tipos principais de óxido nítrico sintases (NOS), produtoras de NO, foram caracterizadas (Knowles e Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1991): enzimas dependentes de cálcio-calmodulina constitutivas nas células endoteliais (NOSe) e neurônios (NOSn), e uma enzima induzida que independe de cálcio (NOSi) nos macrófagos e em muitas outras células. Os tecidos contendo isoformas constitutivas de NOS produzem pequenas quantidades de NO rápida e transitoriamente em resposta a agonistas, tais como acetilcolina ou BK (endotélio vascular), glutamato (cérebro) ou colágeno (plaquetas). Vários tipos de células, incluindo os macrófagos, condrócitos, neutrófilos, células endoteliais, hepatócitos e células musculares lisas, têm sido relacionadas por expressarem NOSi em resposta ao estímulo inflamatório. No entanto, é necessário considerar que existem diferenças entre as espécies. Dependendo dos tipos de células, endotoxinas e certas citocinas, tais como IL-1, TNF- α e INF- γ , induzem a expressão de NOSi. Algumas outras citocinas, como, por exemplo, as interleucinas 4, 8, 10 e 13, o fator de crescimento beta (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), são inibidores da indução de NOSi em certos tipos de células (Moncada, 1992; Nussler e Billiar, 1993; Knowles e Moncada, 1994; Doyle *et al.*, 1994).

Meller *et al.* (1992) sugeriram que uma produção sustentada de NO e a subsequente ativação da guanilato ciclase solúvel na medula espinhal lombar tomam parte na hiperalgesia térmica no modelo de dor neuropática produzida por ligadura do nervo ciático. Por outro lado, a L-N^G-nitro arginina metil ester (L-NAME), administrada por via intraperitoneal, produz antinocicepção de longa duração que independe do sistema opióide em camundongos, provavelmente por efeito direto no SNC (Moore *et al.*, 1991). Ainda, Xin-Quan e Zing-Zu (1993) estudaram o envolvimento da produção de NO e a ativação da guanilato ciclase solúvel no mecanismo de analgesia induzido pela L-arginina. Finalmente, foi demonstrado que o NO espinhal desempenha significativo papel nos mecanismos de respostas comportamentais para a capsaicina, através da liberação de glutamato (Sakurada *et al.*, 1996).

Além dos mediadores descritos, as TKs também constituem um grupo importante de substâncias com caráter pró-inflamatório. As TKs compreendem a SP, a neurocinina A (NKA) e a neurocinina B (NKB), sendo peptídeos cuja fonte neuronal principal, em território somático e visceral do sistema nervoso periférico, são as terminações periféricas de neurônios primários aferentes sensíveis à capsaicina. A síntese de TKs ocorre nos corpos celulares dos neurônios aferentes localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD). Esses elementos expressam o gene pré-prótaquicinina-A (PPT-A), produzindo SP, NKA e outro peptídeo relacionado à NKA. O gene pré-prótaquicinina B (PPT-B) não é expresso no GRD e, em consequência, a NKB está ausente nos terminais nervosos centrais ou periféricos destes aferentes primários. A segunda principal

fonte de TK neuronal são certos corpos celulares de neurônios nos plexos mioentérico e submucoso intestinais. Além dessas, outras fontes de SP são alguns neurônios simpáticos e parassimpáticos que inervam as glândulas salivares e as vias aéreas entre outras (Maggi *et al.*, 1993; Piedimonte, 1995; Sakurada *et al.*, 1997).

Uma vez liberadas, as TKs vão exercer uma variedade de ações mediadas por um ou mais dos três receptores conhecidos para esses peptídeos, denominados NK₁, NK₂ e NK₃. A distribuição desses receptores tem sido investigada por técnicas farmacológicas, autoradiografia com radioligantes e, mais recentemente, pela investigação direta da expressão de RNAm nos tecidos (Maggi, 1995; Sakurada *et al.*, 1997).

Os receptores NK₁ participam das ações das TK, sendo a SP o seu mais potente agonista natural, e estão amplamente distribuídos no SNC e periférico em várias espécies animais (Otsuka e Yoshioka, 1993). No sistema nervoso periférico, o receptor NK₁ toma parte na vasodilatação, no aumento da permeabilidade vascular, na estimulação da secreção salivar e de vias aéreas e na contração de musculatura lisa (Maggi, 1995).

Os receptores NK₂ são definidos como mediadores das ações das taquicininas e de NKA, que é seu agonista natural mais potente. Estão amplamente distribuídos no sistema nervoso periférico e especialmente na musculatura lisa do trato respiratório, gastrointestinal e urinário (Maggi, 1995). A presença e o papel funcional de receptores NK₂ no SNC e na medula espinhal têm sido muito debatidos, contudo estudos mostram que eles estão presentes

no SNC, especialmente em alguns núcleos talâmicos, nas lâminas III e VI do córtex frontal e no hipocampo (Hagan *et al.*, 1993).

O receptor NK₃ é definido como sendo responsável pelas ações biológicas das taquicininas, para as quais a NKB é mais potente agonista que a NKA e a SP. Os receptores NK₃ são abundantemente expressos no SNC (córtex cerebral, núcleo solitário, núcleo interpeduncular, habênula e área tegmental ventral) e na medula espinhal (raiz dorsal) (Buell *et al.*, 1992).

A estimulação de neurônios aferentes de pequeno diâmetro produz sintomas similares àqueles presentes durante a inflamação: vasodilatação, extravasamento de plasma, agregação de plaquetas e ativação dos mastócitos. Tais observações levaram ao termo inflamação neurogênica (IN), que sugere um papel modulatório do sistema nervoso periférico nas respostas inflamatórias (Jancsó *et al.*, 1967; Lembeck e Holzer, 1979; Dimitriadou *et al.*, 1992; Kowalski e Kaiiner, 1988).

O tipo de fibras aferentes envolvido na inflamação neurogênica está bem definido: fibras C e, em menor grau, fibras A δ , que são excitadas (e, em altas doses, destruídas) por capsaicina, um ingrediente da pimenta. As fibras sensíveis à capsaicina contêm um número de peptídeos bioativos, como a SP, a NKA e o CGRP. Estudos funcionais e com auxílio de radioligantes têm estabelecido também para o CGRP que suas ações biológicas são mediadas por receptores específicos (CGRP₁ e CGRP₂, Dennis *et al.*, 1990). Os receptores CGRP têm sido encontrados na musculatura lisa e endotélio vasculares (Wimalawansa e MacIntyre, 1988).

Asma alérgica

A asma é uma doença caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas, na qual participam particularmente mastócitos, eosinófilos e linfócitos T.

Imediatamente após a inalação do alergeno, os mastócitos sensibilizados pela IgE são ativados pelo acoplamento do antígeno aos receptores IGE da superfície de sua membrana celular. A IgE está fixada à membrana do mastócito por um receptor de alta afinidade FcERI. Após a ativação dos mastócitos, são mobilizados os grânulos de seu citoplasma que contêm mediadores (pelo menos 15 substâncias) e citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF $_{\alpha}$). Mediadores lipídicos (LTC $_4$, D $_4$, E $_4$ e PGD $_2$) são também produzidos nos tecidos após a degranulação dos mastócitos pelo metabolismo do AA. O lavado broncoalveolar, na fase precoce da asma, demonstra aumento das concentrações principalmente de triptase, histamina, LTC $_4$, PGD $_2$ e PGF $_{2\alpha}$, potentes broncoconstritores, que determinam também aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de muco e estimulação nervosa aferente (Warner e Kroegel, 1994).

Outro evento importante no processo inflamatório das vias aéreas é a adesão de moléculas às células endoteliais e leucócitos. No recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, várias moléculas de adesão celular (CAMs) e citocinas quimiotáticas participam ativamente (Manning *et al.*, 1994). As moléculas de adesão estão divididas em três famílias: integrinas, selectinas e a superfamília de imunoglobulinas (Kumar e Busse, 1995). No processo da inflamação, ocorre, inicialmente, a vasodilatação de vênulas pós-capilares e

mudanças no fluxo sanguíneo, resultando na marginalização de leucócitos. Essas células são capturadas pelas selectinas-L através de uma ligação fraca e reversível que permite o seu “rolamento” nas paredes dos vasos (Kroegel *et al.*, 1994). As selectinas E e P das células endoteliais dos focos de inflamação servem como ligantes para selectinas-L específicas de leucócitos. As integrinas VLA-4 (*very late antigen 4*), LFA-1 (*leucocyte function associated antigen*) e Mac-1 são responsáveis por um aumento de afinidade e expressão de adesão molecular na superfície dos leucócitos. Finalmente, um grupo de moléculas expressas no endotélio vascular liga-se às β_2 integrinas da superfície dos leucócitos, facilitando a adesividade intercelular ao endotélio microvascular (Lamas *et al.*, 1988; Wegner *et al.*, 1990). Incluem-se nesse grupo (da superfamília das imunoglobulinas) a ICAM-1, ICAM-2 e a molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1).

Os leucócitos fixam-se à superfície endotelial, onde encontram altas concentrações de citocinas, agentes quimiotáticos e mediadores lipídicos. Esses produtos dos linfócitos e macrófagos difundem-se do foco inflamatório do espaço perivascular, ou mesmo das células do próprio endotélio vascular, e ativam os leucócitos. Baixas concentrações de IL-8 (Huber *et al.*, 1991), produzidas pelo endotélio vascular e secretadas nas regiões subendoteliais, aumentam a adesão leucocitária e induzem sua migração. Outras substâncias quimiotáticas, como IL-2, IL-5, RANTES (*regulated upon activation in normal T-cells, expressed, and secreted*) e PAF, favorecem a migração transendotelial para o espaço extravascular.

Outra célula numericamente importante na inflamação inicial e tardia da asma é o eosinófilo. Este também produz citocinas IL-3, IL-5 e fator estimulante de colônias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF), as quais produzem maior diferenciação eosinofílica, quimiotaxia e ativação, determinando uma autoperpetuação da infiltração inflamatória eosinofílica. Como os mastócitos, os eosinófilos secretam mediadores lipídicos PAF, LTs, PGs e TXs. Os linfócitos T apresentam importante papel na inflamação, através da ativação de citocinas responsáveis pela interação entre as células. As citocinas produzidas pelos linfócitos T atuam transmitindo sinais para a regulação da proliferação celular e diferenciação. Os linfócitos possuem vida longa e memória imune e também podem ser ativados por alergenios; sua importância na doença é sugerida pelo aumento de linfócitos T CD4-positivos ativados encontrados no lavado broncoalveolar e em biópsias brônquicas (Kumar e Busse, 1995).

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1 - Analisar, em camundongos, os possíveis efeitos antinociceptivos do poligodial, sesquiterpeno obtido das cascas da *D. winteri*, administrado por via sistêmica, intratecal, intracerebroventricular ou intraplantar nos modelos de dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético, caolim e zimosan, ou pela injeção intraplantar de formalina e capsaicina.

2 - Analisar, no modelo de dor induzida pela formalina em camundongos, os possíveis mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas do poligodial, empregando para tal agonistas e antagonistas específicos de vários receptores, bem como inibidores enzimáticos de substâncias que participam da gênese da dor.

3 - Analisar, no teste da placa quente, possível efeito do poligodial na hiperalgesia induzida pelo glutamato administrado por via intratecal em camundongos.

4 - Analisar, em camundongos, os possíveis efeitos antiinflamatórios do poligodial nos modelos de edema de pata induzidos por BK, por carragenina, por dextrana, PLA₂, PGE₂ e SP; nos edemas de orelha induzidos por AA, por capsaicina e óleo de cróton, e na pleurisia induzida por carragenina.

5 - Finalmente, analisar os possíveis efeitos antialérgicos do poligodial através de choque anafilático induzido em camundongos sensibilizados pela OVO e no edema alérgico causado pelo antígeno em ratos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos e fêmeas (18 a 35 g) e ratos machos Wistar (140 a 180 g), mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFSC, em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/ escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h) e com acesso à água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos no laboratório para adaptação por um período de pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Os experimentos foram realizados geralmente entre 8 e 17 horas, à temperatura ambiente de 20 ± 3 °C, sendo que cada animal foi usado apenas uma vez. Os camundongos fêmeas foram utilizados exclusivamente nos experimentos de pleurisia. Os experimentos desenvolvidos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

3.2 - Classificação botânica da *Drymis winteri*

As cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae) foram coletadas no município de Bom Retiro-SC, e a classificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Botânica da UFSC pela professora Leila da Graça Amaral. Um exemplar da planta está depositado e registrado sob o número 26 313 no

Herbário FLOR, do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis-SC (Figura 1).

3.3 - Análise química e preparação do composto poligodial

O estudo fitoquímico para o isolamento e a caracterização química do poligodial, isolado das cascas da *D. winteri*, foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da UFSC, pelos professores drs. Rosendo A. Yunes e Valdir Cechinel Filho. As cascas da *D. winteri* foram secas em estufa a uma temperatura de 45 - 50 °C. O material seco foi cortado em pequenas peças e macerado com metanol comercial à temperatura ambiente, durante dez dias. O extrato metanólico foi exaustivamente fracionado com diclorometano e, depois da remoção do solvente, a fração foi submetida à cromatografia (Merck 60), resultando no isolamento do composto poligodial, conforme descrito anteriormente (Cechinel Filho *et al.*, 1998). O poligodial foi identificado através de comparação direta com amostra autêntica e através de dados espectroscópicos (ressonância nuclear magnética de próton e ressonância nuclear magnética carbono-13). Uma porção de material seco das cascas da planta, equivalente a 750 g, rendeu 240 mg de poligodial, correspondendo a um rendimento de 0,032% (Cechinel Filho *et al.*, 1998). A estrutura molecular do composto poligodial isolado das cascas da *D. winteri* está apresentada na Figura 2.

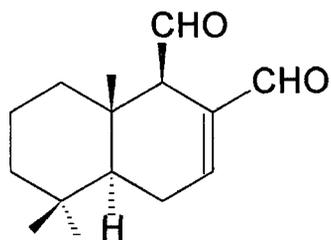


Figura 2 - Estrutura molecular do composto poligodial isolado das cascas da *Drymis winteri*.

3.4 - Análise farmacológica

3.4.1- Atividade antinociceptiva

3.4.1.1 - Teste das contorções abdominais em camundongos

Inicialmente, foi avaliada a atividade antinociceptiva do poligodial, utilizando-se o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, zimosan e caolim. As contorções abdominais são caracterizadas por contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, (Collier *et al.*, 1968; Bentley *et al.*, 1981). O teste das contorções abdominais, embora seja um modelo simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto no periférico. Grupos distintos de animais foram tratados com poligodial nas doses de 0,21 a 42,7 $\mu\text{mol/kg}$ (0,5 a 10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes da injeção de ácido acético (0,6%), da

suspensão de zimosan (40 mg/kg) ou da suspensão de caolim (50 mg/kg). Os grupos-controle receberam o mesmo volume de veículo (10 ml/kg, i.p.) utilizado para diluir o composto. Após as injeções dos irritantes, os camundongos foram observados em pares, colocados individualmente sob funis de vidro invertidos, quantificando-se cumulativamente o número de contorções abdominais durante um período de 20 min, para o ácido acético e caolim, e de 15 min, para o zimosan. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais tratados com o poligodial i.p. em relação ao número das contorções abdominais dos animais-controle tratados com salina.

3.4.1.2 - Dor induzida pela formalina em camundongos

A ação antinociceptiva do poligodial, bem como a duração do seu efeito também foram avaliadas através do teste da dor induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina. Esse teste permite avaliar dois tipos de dor: uma de origem neurogênica, como resultado da estimulação direta dos neurônios nociceptivos, observada nos primeiros 5 min após a injeção da formalina, e outra de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, observada entre 15 e 30 min após a injeção de formalina e representando a resposta tônica à dor.

Os procedimentos foram realizados como descrito anteriormente (Hunskaar *et al.*, 1985, 1986; Murray *et al.*, 1988; Corrêa e Calixto, 1993). Nos animais, foram injetados 20 μ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído),

preparada em uma solução tamponada com fosfato (PBS), na região plantar da pata posterior direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro invertido, com auxílio de um espelho para permitir melhor observação. A seguir, foi cronometrado por um período de 30 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse período considerado como indicativo de dor (Hunskaar e Hole, 1987). Os animais foram tratados com poligodial pelas vias i.p. (12,8 - 128,2 $\mu\text{mol/kg}$) (3 a 30 mg/kg), oral (21,3 - 427 $\mu\text{mol/kg}$) (5 a 100 mg/kg), intracerebroventricular (i.c.v.) (10 - 300 nmol/sítio) (2,3 a 70,2 $\mu\text{g/sítio}$), intratecal (i.t.) (30 - 300 nmol/sítio) (7 a 70,2 $\mu\text{g/sítio}$) e i.pl. (30 - 300 nmol/sítio, em associação com a formalina) (7 a 70,2 $\mu\text{g/sítio}$). Para as injeções i.c.v. e i.t., os animais foram levemente anestesiados com éter e um volume de 5 μl de veículo, ou o veículo contendo poligodial (10 - 300 nmol/sítio) (2,3 a 70,2 $\mu\text{g/sítio}$) foi injetado diretamente dentro do ventrículo lateral (coordenadas para a localização em relação ao bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; -3 mm vertical), ou na medula espinhal (entre as vértebras L5 e L6), respectivamente, com o auxílio de uma microseringa conectada a um tubo de polietileno, como descrito previamente (Hylden e Wilcox, 1980; Vaz *et al.*, 1996; Santos e Calixto, 1997). Os animais-controle receberam por vias i.c.v. e i.t. o mesmo volume de veículo e, 15 min depois, receberam a injeção i.pl. de formalina na pata traseira direita. No final do tempo de observação, os animais tratados com o composto poligodial foram sacrificados por deslocamento cervical; as patas posteriores foram cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas

em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina. A diferença entre o peso das patas direita e esquerda (em mg) foi considerada como índice de edema. Um outro grupo de animais recebeu poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e foi estabelecido um perfil temporal para a ação do composto, sendo que o poligodial foi administrado 0,5, 1 e 2 horas antes da injeção i.pl. de formalina.

3.4.1.3 - Dor induzida pela capsaicina em camundongos

Este modelo, proposto por Sakurada *et al.* (1992), é importante para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa das fibras C, em especial as TKs (SP, NKA e NKB) (Sakurada *et al.*, 1992; 1993). Este teste foi empregado visando evidenciar a possível interação do composto poligodial isolado das cascas da *D. winteri* com o sistema taquicinérgico.

Os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro transparente invertido por um período de adaptação de, no mínimo, 20 min. Posteriormente, cada animal recebeu 20 μl de solução de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$), injetada na região plantar da pata posterior direita. O tempo em que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a pata injetada com capsaicina foi considerado como indicativo de dor (Sakurada *et al.*, 1992; 1993). A reação à dor induzida pela capsaicina foi observada durante 5 minutos. Os animais foram tratados com o composto poligodial por via oral (21,3 - 427 $\mu\text{mol/kg}$) (5 a 100

mg/kg), i.p. (12,8 - 128,2 μ mol/kg) (3 a 30 mg/kg), i.c.v. (10 - 300 nmol/sítio) (2,3 a 70,2 μ g/sítio), i.t. (30 - 300 nmol/sítio) (7 a 70,2 μ g/sítio) ou i.pl. (30 - 300 nmol/sítio, em associação com a capsaicina) (7 a 70,2 μ g/sítio), conforme técnicas descritas no teste de dor induzida pela formalina. O grupo-controle recebeu, pelas mesmas vias, o veículo usado para diluir o composto.

3.4.1.4 - Teste da placa quente em camundongos

Os animais foram colocados dentro de um cilindro de acrílico, sobre a superfície de uma placa de metal previamente aquecida a 56 ± 1 °C, utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Modelo- DS 37). O tempo (em segundos) que o animal levou para lambe, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo (Eddy e Leimback, 1953). Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos, de acordo com sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram por um período superior a 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico. O tempo máximo de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s, sendo esse tempo considerado como índice máximo de analgesia. Os animais foram tratados com poligodol (42,7 μ mol/kg, i.p.) ou com morfina (13,3 μ mol/kg, s.c., utilizada como controle positivo). O grupo-controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir o composto ou a morfina.

3.4.1.5 - Efeito sobre a performance motora (*rota-rod*) em camundongos

O objetivo deste teste foi evidenciar o possível efeito depressor do composto poligodial sobre o sistema nervoso central ou periférico. Os animais foram analisados no teste do *rota-rod*, que permite avaliar o possível efeito do composto sobre a performance motora, independentemente de atuar em nível de sistema nervoso central ou periférico (Duham e Miya, 1957; Rosland *et al.*, 1990). Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho por pelo menos dois períodos consecutivos de 60 s cada, conforme descrito por Duham e Miya (1957). O aparelho denominado *rota-rod*, é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em seis compartimentos que giram a 14 r.p.m., dispostos a 25 cm de altura. Os animais selecionados foram tratados com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou com o veículo usado para diluir o composto. A seguir, foram analisados no aparelho *rota-rod* (Ugo Basile, model-DS 37) por um período de 60 s, em vários intervalos de tempo (15, 30 e 60 min) após o tratamento com o composto ou com o veículo.

3.4.1.6 - Hiperalgisia induzida pelo glutamato em camundongos

Em uma outra série de experimentos, verificou-se o efeito do poligodial sobre a hiperalgisia induzida pela injeção i.t. de glutamato. Para tanto, foi utilizado o aparelho da placa quente, aquecido à temperatura de 50 ± 1 °C. Os animais receberam uma injeção i.t. de glutamato (100 nmol/sítio) e foram observados na placa quente 5, 15, 30 e 60 min após a injeção (Aanonsen e

Wilcox, 1987; Beirith *et al.*, 1998). Os animais foram tratados com o veículo (solução salina 0,9%) ou com poligodial (42,7 e 128,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 30 min antes da injeção i.t. de glutamato. A medida da atividade anti-hiperalgésica foi baseada no aumento do tempo (s) de permanência dos animais na placa quente após o tratamento com o composto. O tempo de permanência dos animais na placa quente foi convertido em dados percentuais, sendo utilizada a fórmula $TF - TI$ (tempo final) - TI (tempo inicial) / $30 - TI$ (tempo inicial) = efeito máximo (%) (adaptada de Aanonsen e Wilcox, 1987).

3.4.2 - Estudo em camundongos do mecanismo de ação analgésica do poligodial

3.4.2.1 - Influência do pré-tratamento com naioxona

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo do poligodial, os animais foram pré-tratados com antagonista opióide não-seletivo, naioxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (5 mg/kg) 15 min antes da administração do composto (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), da injeção de morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg, utilizada como controle positivo) ou de salina (10 mg/kg, i.p.) (Santos *et al.*, 1995; Vaz, *et al.*, 1996). Decorridos 30 min da administração do poligodial, da morfina ou do veículo, os animais foram analisados no teste da formalina. Os grupos-controle foram tratados com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina, ou com o veículo utilizado para diluir o composto ou a morfina, 30 min antes da injeção de formalina.

3.4.2.2 - Influência do pré-tratamento com ioimbina e prazosin

Com o objetivo de avaliar a participação dos alfa-adrenoceptores na ação antinociceptiva induzida pelo poligodial, os animais foram pré-tratados com os antagonistas de adrenoceptores α_1 (prazosin; 0,35 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,15 mg/kg), ou α_2 (ioimbina; 0,38 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,15 mg/kg) (Uhlén *et al.*, 1990; Tasker *et al.*, 1992). Decorridos 15 min, os animais receberam poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ou os agonistas dos adrenoceptores α_1 (fenilefrina; 49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg), α_2 (clonidina; 3,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,1 mg/kg) ou salina (10 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após a administração do composto e/ou drogas padrão, o efeito dos tratamentos foi avaliado em relação a ambas as fases da dor induzida pela injeção de formalina em camundongos. Os grupos-controle receberam somente o composto poligodial, os agonistas adrenérgicos ou, ainda, o veículo usado para diluir o composto e as drogas 30 min antes da injeção de formalina.

3.4.2.3 - Influência do pré-tratamento com L-arginina

Para a avaliação de um possível envolvimento da via do óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pelo poligodial, os animais receberam o precursor do óxido nítrico, L-arginina (3,5 mmol/kg, i.p.) (600 mg/kg) e, decorridos 15 min, foram tratados com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase N^w-nitro-L-arginina (L-NOARG, 342 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (75 mg/kg) ou com salina (10 mg/kg, i.p.) (Santos *et al.*, 1995; Vaz *et al.*, 1996). Decorridos 30 min do tratamento, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela injeção de formalina. Os

animais-controle foram tratados com poligodial, L-NOARG ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 min antes da injeção da formalina.

3.4.2.4 - Influência do pré-tratamento com faclofen e bicuculina

Para verificar a participação do sistema GABAérgico no efeito antinociceptivo produzido pelo poligodial, os animais foram pré-tratados com bicuculina (1,9 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1 mg/kg) (antagonista seletivo de receptores GABA_A), faclofen (40 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg) (antagonista seletivo de receptores GABA_B), (Shafizadeh *et al.*, 1997), ambos 15 min antes da administração de poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), muscimol (8,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1 mg/kg) (agonista seletivo de receptores GABA_A), ou baclofen (4,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1 mg/kg) (agonista seletivo de receptores GABA_B) (Rahman *et al.*, 1995) ou salina (10 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 min dos tratamentos, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Os grupos-controle receberam somente poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), os agonistas GABAérgicos (muscimol 8,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. ou baclofen 4,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ou salina, 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina.

3.4.2.5 - Influência do pré-tratamento com PCPA

Considerando a possibilidade de que o sistema serotoninérgico possa participar da ação antinociceptiva do poligodial, outro grupo de animais foi pré-tratado com p-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de 5-HT, uma vez ao dia (399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (100 mg/kg), durante quatro dias consecutivos

(Taber e Latranyi, 1981; Vaz *et al.*, 1996; Beirith *et al.*, 1998). Transcorridos trinta minutos após o último tratamento com PCPA, os animais receberam poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou somente o veículo usado para diluir as substâncias. Depois de 30 min, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Os animais-controle receberam somente poligodial, morfina ou veículo 30 min antes da injeção da formallna.

3.4.2.6 - Influência do pré-tratamento com toxina pertussis

Tem sido demonstrado que o pré-tratamento de animais com toxina pertussis pela via i.c.v. suprime o efeito analgésico causado por drogas que atuam ativando a proteína G_i/G_o , através da ribosilação do ATP da proteína G_i/G_o (Sánchez-Blásquez & Garzón, 1991; Hernandez *et al.*, 1995; Beirith *et al.*, 1998). Para investigar a possível participação da proteína G_i/G_o (sensível à toxina pertussis) na ação antinociceptiva do poligodial, os animais foram pré-tratados com toxina pertussis (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) sete dias antes da administração de poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), usada como controle positivo, ou salina (10 mg/kg, i.p.). Outro grupo de animais foi pré-tratado com salina (NaCl 0,9%, 5 $\mu\text{l/sítio}$, i.c.v.) e, sete dias depois, recebeu poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou o veículo 30 min antes da injeção de formalina. A seguir, os animais foram analisados no teste da formalina, conforme os procedimentos descritos anteriormente.

3.4.2.7 - Influência do pré-tratamento com glibenclamida

Para investigar o possível papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) sobre o efeito antinociceptivo produzido pelo poligodial, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (81 nmol/sítio, i.c.v.) (40 μ g/sítio), um bloqueador de canal de K_{ATP} e, depois de 15 min, receberam poligodial (42,7 μ mol/kg, i.p.), morfina (13,3 μ mol/kg, s.c.) ou salina (10 ml/kg, i.p.) (Raffa e Martinez, 1995; Shewade e Ramaswamy, 1995). A seguir, os animais foram analisados no teste da formalina. Outro grupo de animais recebeu salina i.c.v. 15 min antes da administração de poligodial, morfina ou salina; 30 min depois, esses receberam a injeção i.pl. de formalina, sendo também analisados conforme descrito acima.

3.4.2.8 - Efeito da adrenalectomia

Com a finalidade de verificar uma possível participação dos glicocorticóides endógenos na ação antinociceptiva causada pelo poligodial, os animais foram submetidos à adrenalectomia bilateral (Flower, *et al.*, 1986). Através de incisão dorsal, sob anestesia com tribromoetanol (2,5%), os animais tiveram retiradas ambas as glândulas adrenais. Após a cirurgia, os animais retornaram para o biotério, com livre acesso à água e ração, sendo a água substituída por solução de salina (a fim de manter as concentrações fisiológicas plasmáticas de sódio). Decorridos sete dias da cirurgia, os animais receberam poligodial (42,7 μ mol/kg, i.p.) ou somente o veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento, foram analisados em relação a ambas as fases da dor induzida

pela formalina. Os animais-controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem que fossem retiradas as adrenais (falso-operados); depois de sete dias, foram submetidos ao mesmo protocolo dos animais operados. Os animais falso-operados receberam água normal durante o período de recuperação da cirurgia.

3.4.2.9 - Desenvolvimento de tolerância cruzada entre morfina e poligodial

Tem sido demonstrado que o tratamento crônico com a morfina pode induzir tolerância no teste da formalina. Com base nesse modelo, verificou-se a possibilidade de desenvolvimento de tolerância cruzada entre a morfina e o poligodial nos animais tratados por sete dias com morfina. Grupos de animais foram pré-tratados com morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), ou com salina (10 ml/kg), durante sete dias antes da realização do teste de dor induzido pela formalina. Os animais receberam uma injeção diária administrada por via s.c. às 9h, durante seis dias, e uma última injeção no sétimo dia, às 8h, com morfina ou com veículo. Após 30 min da última injeção de morfina, o composto poligodial foi administrado (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) em camundongos tolerantes e não tolerantes ao opióide, e os efeitos antinociceptivos foram avaliados 30 min depois no teste da formalina. A tolerância cruzada foi definida como uma significativa redução nos efeitos antinociceptivos da morfina e do poligodial em camundongos tolerantes à morfina e em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (Connel *et al.*, 1994).

3.4.3 - Atividade antiinflamatória

3.4.3.1 - Edema de pata em camundongos

Para a indução do edema, os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e receberam, por via i.pl. e na pata direita, 50 μ l de PBS, contendo BK (3 nmol/pata), carragenina (300 μ g/pata), dextrana (100 μ g/pata), PLA₂ (5 U/pata), PGE₂ (30 nmol/pata) ou SP (20 nmol/pata). A pata esquerda recebeu o mesmo volume (50 μ l) de PBS e foi utilizada como controle. O aumento do volume da pata foi medido (exceto para a PLA₂) pletismometricamente (Pletismômetro, Ugo Basile, Itália) em vários intervalos de tempo (10, 20, 30, 60 e 120 min após a injeção de BK; 30, 60, 120 e 240 min após as injeções de carragenina, dextrana e PGE₂; 15, 30, 45, 60, 120 e 180 min após a injeção de SP). A diferença entre os volumes das patas direita e esquerda foi quantificada (em μ l) e tomada como índice de edema. O aumento do volume das patas induzido por PLA₂ foi medido no pico do edema (30 min após a injeção de PLA₂), considerando-se a diferença entre o seu peso (mg) com índice de edema. No experimento em que se utilizou a BK, os animais foram pré-tratados com o inibidor da cininase II, o captopril (5 mg/kg, 1 h, s.c.), a fim de prevenir a degradação do peptídeo (Corrêa e Calixto, 1993). Os animais foram tratados com poligodial (12,8 - 128,1 μ mol/kg, i.p.) 30 minutos antes das injeções dos indutores de edema.

3.4.3.2 - Edema de orelha em camundongos

Para estudar a atividade antiedematogênica do composto poligodial, foi utilizado o modelo do edema de orelha em camundongos. O edema foi induzido pela aplicação tópica de 20 μ l de cada uma das seguintes substâncias irritantes: capsaicina (250 μ g/orelha), óleo de cróton (1 mg/orelha) ou AA (2 mg/orelha). Todos os agentes flogísticos foram dissolvidos em acetona. As substâncias foram aplicadas diretamente nas superfícies interna e externa da orelha direita (20 μ l). A orelha esquerda recebeu o mesmo volume de acetona e foi usada como controle. No período apropriado de tempo (30 min para a capsaicina; 6 horas para o óleo de cróton; 1 hora para o AA), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo removido um disco de 6 mm de diâmetro de cada orelha com o auxílio de um aparelho metálico. A resposta edematogênica foi avaliada através da diferença de peso (em mg) entre a orelha direita e a orelha esquerda (Calixto e Medeiros, 1991; Neves *et al.*, 1993). O poligodial foi administrado 30 min antes das substâncias irritantes (42,7 - 427,0 μ mol/kg, i.p.).

3.4.3.3 - Modelo da pleurisia em camundongos

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, cada animal foi tratado com solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml, i.v.) para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (Henriques *et al.*, 1990; Henriques, 1993; Saleh *et al.*, 1996). No dia da indução da pleurisia, os animais foram levemente anestesiados com éter etílico e 0,1 ml de solução fisiológica estéril (salina 0,9%) ou de carragenina (1%, diluída em salina), injetados na

cavidade pleural direita através do espaço intercostal. De acordo com o protocolo experimental, após a administração do agente flogístico, os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo com uma *overdose* de éter etílico. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida, o apêndice xifóide foi pinçado e, através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, os pulmões e ambas as cavidades pleurais foram expostos. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com 1 ml de PBS (pH 7,6) heparinizado (20 UI/ml). A seguir, o volume líquido na cavidade pleural foi coletado com o auxílio de pipetas automáticas. Após a lavagem da cavidade pleural com solução salina tamponada e heparinizada, uma alíquota (500 µl) do volume recolhido foi separada para determinação dos níveis de azul de Evans (exsudato). Os níveis de azul de Evans foram determinados por espectrofotometria (Hitachi, U-2001), por leitura de densidade ótica, em comprimento de onda de 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em µg/ml com auxílio da equação da reta.

No dia dos experimentos, uma alíquota do lavado foi reservada para a contagem total celular. A leitura do número total de células foi feita com o auxílio de um contador de células (Coulter F-980). Outra alíquota (100 a 150 µl) do volume coletado foi destinada à realização de esfregaços celulares. Após a preparação dos esfregaços, que foram feitos com o auxílio de centrífuga

(Cytospin 3, Shandon), esses foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, sendo a contagem diferencial celular (neutrófilos, eosinófilos e mononucleares) feita em microscopia ótica comum com auxílio de objetiva de imersão (aumento de oitocentas vezes), contando-se cem células por lâmina. Os animais foram tratados com poligodial (12,8 - 128,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou salina (10 ml/kg) 30 min antes da indução da pleurisia induzida pela carragenina, e os parâmetros inflamatórios foram analisados 4 h após.

3.4.4 - Atividade antialérgica

3.4.4.1 - Choque anafilático em camundongos

Visando analisar a possível atividade antialérgica do poligodial, camundongos foram ativamente sensibilizados através de injeção subcutânea de 0,2 ml de salina (0,9%), contendo 20 μg de OVO dispersa em 1 mg de hidróxido de alumínio (Amorim *et al.*, 1993; Tratsk *et al.*, 1998). Decorridos 14 dias, os animais receberam uma nova injeção de OVO em salina, sem hidróxido de alumínio. Passados mais sete dias, os animais foram tratados com poligodial 42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., ou com solução salina 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h antes da injeção de OVO (500 $\mu\text{g/kg}$, i.v.). Para efeito de comparação, outro grupo de animais foi tratado com dexametasona (2 mg/kg, s.c.) 6, 12, 24 e 48 h antes da injeção de OVO. A morte dos animais decorrente da injeção endovenosa de OVO foi definida pela cessação dos movimentos respiratórios. O número de animais sobreviventes em cada grupo foi quantificado num período de 60 min após a injeção do antígeno.

3.4.4.2 - Edema alérgico em ratos

Para o edema alérgico, os experimentos foram conduzidos usando ratos ativamente sensibilizados através de injeção subcutânea de 50 μg de OVO dispersa em 5 mg de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), dissolvido em 0,1 ml de solução salina (Amorim *et al.*, 1993). Após 14 dias, o edema foi induzido pela injeção de 6 μg de OVO na pata traseira esquerda do animal. A pata contralateral recebeu o mesmo volume em PBS e serviu como controle. Os animais foram tratados com poligodial (4,2 - 42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 30 min antes. O edema foi medido com o uso de um pletismômetro (Ugo Basile) nos tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção de OVO, sendo expresso como a diferença (em ml) entre ambas as patas.

3.5 - Drogas e soluções

Os experimentos realizados utilizaram as seguintes drogas e soluções: formalina, hidrocloreto de clonidina, hidrocloreto de fenilefrina, hidrocloreto de ioimbina, hidrocloreto de morfina, indometacina, L-arginina, N^{W} -nitro-L-arginina, toxina pertussis, 2,2,2-tribromoetanol, bradicinina, prostaglandina E_2 , substância P, carragenina lambda (grau IV), caolim, zimosan A, dextrana, óleo de cróton, ácido araquidônico, fosfolipase A_2 , bicuculina, dexametasona, glutamato, ovoalbumina, hidrocloreto de p-clorofenilalanina-metil-éster, azul de Evans (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA), capsaicina (Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA), hidrocloreto de prazosin (Pfizer, Nova Iorque, EUA), hidrocloreto de naloxona (Dupont, Garden City, EUA), glibenclamida, baclofen,

faclofen (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA), PBS, ácido acético glacial (Merck, Brasil), muscimol (Tocris, Baiwin, USA), solução salina (0,9%) de diferentes fontes comerciais e hidróxido de alumínio (Vetec). A maioria das drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%). As soluções-estoque de BK, prostaglandina E₂ e substância P foram preparadas em PBS (1 - 10 mM) em tubos siliconizados, mantidos a -18 °C, e diluídas na concentração desejada no dia dos experimentos. A dexametasona foi diluída em 5% de etanol, e a capsaicina foi diluída em etanol absoluto. A capsaicina (para teste no edema de orelha) foi diluída em acetona. O poligodial foi isolado das cascas da *D. winteri* pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, como descrito previamente (El Sayah *et al.*,1998; Cechinel Filho *et al.*,1998). O grau de pureza da substância obtida foi igual a 98%. O poligodial foi dissolvido em tween 80 ou etanol absoluto, sendo que suas concentrações finais não excederam a 5%, de modo a não influenciar os efeitos causados pelo composto.

3.6 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50s} (doses do composto que reduziram a resposta para 50% em relação ao grupo-controle), que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95% (Fleming *et al.*,1972). As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet,

Newman Keuls ou Tukey-Kramer. O teste de qui-quadrado foi usado para comparação da taxa de sobrevivência após a administração de ovoalbumina, em animais previamente sensibilizados. Valores de $P < 0,05$ ou menos foram considerados como indicativos de significância. As DI_{50} s foram estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica em papel semilogarítmico.

4 - RESULTADOS

4.1 - Efeito do poligodial no teste das contorções abdominais

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que o poligodial (0,21 a 42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (1 a 10 mg/kg), administrado 30 minutos antes, produziu inibição significativa e de forma dose-dependente das contorções abdominais induzidas pelas injeções de ácido acético, zimosan ou caolim. Os valores médios calculados para as $\text{DI}_{50\text{s}}$ e seus respectivos limites de confiança foram de 0,6 (0,5 - 1,0), 1,7 (1,1 - 2,6) e 2,1 (1,5 - 2,8) $\mu\text{mol/kg}$, com inibições máximas (média \pm EPM) de $90,0 \pm 3,0$, $97,0 \pm 2,0$ e $98,0 \pm 1,0\%$, em relação ao ácido acético, zimosan e caolim, respectivamente.

4.2 - Dor induzida pela formalina

Os resultados iniciais apresentados neste modelo, primeiramente, estabelecem um perfil temporal para o efeito do poligodial na dose de 42,7 $\mu\text{mol/kg}$, administrado intraperitonealmente, bem como o seu efeito no edema de pata induzido pela formalina. Como pode ser observado na figura 4, a resposta antinociceptiva máxima do poligodial ocorreu quando o composto foi administrado 0,5 e 1 h antes da injeção plantar de formalina, mostrando-se reduzida em 2 horas (Figura 4 A e B). Por outro lado, o poligodial (12,8 - 128,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) não foi capaz de inibir o edema de pata associado à segunda fase da dor desse modelo, medido 30 min após a injeção de formalina (Figura 4 C).

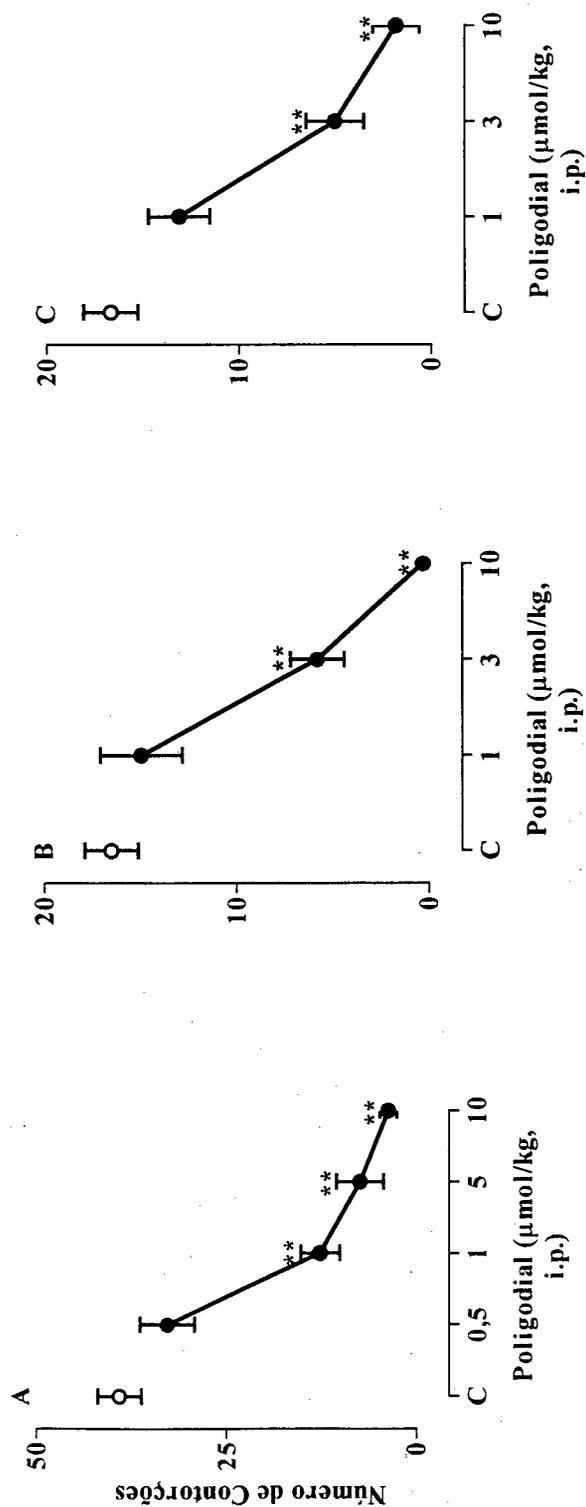


FIGURA 3. Efeito do tratamento intraperitoneal com poligodial (0,21 - 42,7 µmol/kg, i.p., 30 min antes) sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (A), caolim (B) ou zimosan (C) em camundongos. O número total de contorções foi medido durante os primeiros 20 min (ácido acético e caolim) ou 15 min (zimosan) depois da injeção intraperitoneal das substâncias irritantes. Cada ponto representa a média de oito a dez animais, e as barras transversais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P > 0,01$.

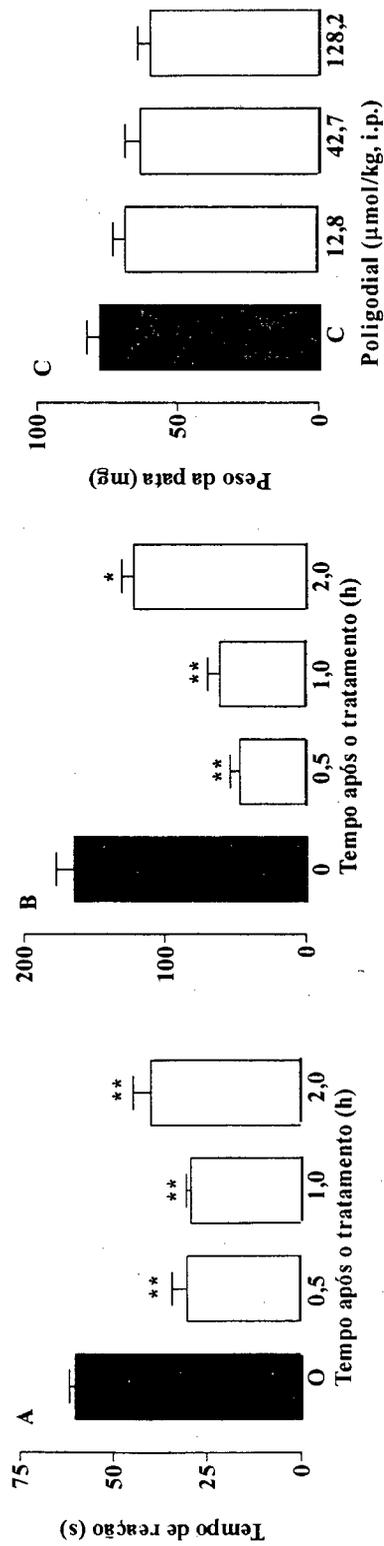


FIGURA 4. Perfil temporal do efeito antinociceptivo do poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg, i.p.}$) em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. O tempo total de reação à dor foi medido na primeira fase entre 0 e 5 min e na segunda fase entre 15 e 30 min após a injeção da formalina. Efeito do poligodial administrado 30 min antes, no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de formalina (C). Cada coluna representa a média de seis a oito animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Os resultados apresentados na Figura 5 (painéis superior e inferior) mostram que o poligodial administrado pelas vias i.p. ou oral (12,8 - 420,7 $\mu\text{mol/kg}$) (3 a 100 mg/kg), 30 min antes do teste, respectivamente, causou inibição de forma dose-dependente e significativa sobre a primeira (0 a 5 min) e a segunda fase (15 a 30 min) da dor induzida pela formalina. Quando administrado por via intraperitoneal, as médias dos valores das DI_{50} para ambas as fases da dor foram: 32,0 (28,0 - 36,0) e 28,0 (27,0 - 29,0) $\mu\text{mol/kg}$, com inibições máximas (%) de $62,0 \pm 2,0$ e $82,0 \pm 4,0$. Para a via oral, as médias dos valores das DI_{50} para ambas as fases da dor foram 58,0 (45,0 - 75,0) e 234,0 (199,0 - 276,0) $\mu\text{mol/kg}$, e as inibições máximas de $81,0 \pm 2,0$ e $95,0 \pm 5,0\%$, respectivamente. Administrado oralmente, o poligodial foi aproximadamente duas a dez vezes menos potente que quando administrado intraperitonealmente (Tabela 1).

As injeções i.c.v. e i.t. de poligodial (10 a 300 nmol/sítio) (2,3 a 70,2 $\mu\text{g/sítio}$) produziram inibição de forma dose-dependente de ambas as fases da dor induzida pela formalina (Figura 6). Com base nas DI_{50} s, o poligodial foi 7 a 150 vezes menos potente que a morfina (Tabela 1). Os valores médios calculados para as DI_{50} s do poligodial, para a primeira fase, foram: 50,0 (36,0-68,0) e 88,0 (83,0-94,0) nmol/sítio, e inibições máximas (%) de $88,0 \pm 5,0$ e $50,0 \pm 7,0$; para a segunda fase de 28,0 (21,0-36,0) e 154,0 (102,0-233,0) nmol/sítio, e inibições máximas de $97,1 \pm 1,0$ e $70,0 \pm 8,0$, respectivamente, para o poligodial administrado pelas vias i.c.v. e i.t., quando testado contra ambas as fases do teste da formalina. A injeção intraplantar de poligodial (30 - 300

Tabela 1- Comparação entre os valores médios das DI_{50} s para as ações antinociceptivas do poligodial, morfina, aspirina e dipirona no teste da formalina em camundongos.

Drogas	Formalina	
	Primeira fase	Segunda fase
	DI_{50}	DI_{50}
Poligodial		
Intraperitoneal ($\mu\text{mol/kg}$)	32,0 (28,0 - 36,0)	28,0 (27,0 - 29,0)
Oral ($\mu\text{mol/kg}$)	58,4 (45,3 - 75,3)	234,6 (199,0 - 276,6)
Subplantar (nmol/pata)	~100	93,0 (90,0 - 95,0)
I.c.v. (nmol/sítio)	50,1 (36,5 - 68,5)	28,1 (21,5 - 36,9)
Intratecal (nmol/sítio)	88,9 (83,2 - 94,9)	154,0 (102,0 - 233,0)
Morfina^a		
Subcutânea ($\mu\text{mol/kg}$)	3,7 (2,4 - 5,4)	4,7 (3,3 - 7,0)
I.c.v. (nmol/sítio)	4,2 (3,5 - 5,0)	4,1 (3,1 - 5,0)
Intratecal (nmol/sítio)	2,4 (1,8 - 5,0)	1,0 (0,4 - 2,6)
Aspirina^a		
Intraperitoneal ($\mu\text{mol/kg}$)	>1110,0	1565,0 (1348,0 - 1820,0)
Oral ($\mu\text{mol/kg}$)	>3330,6	1565,0 (1348,0 - 1820,0)
Dipirona^b		
Intraperitoneal ($\mu\text{mol/kg}$)	154,5 (99,9 - 238,8)	263,7 (234,3 - 296,9)
I.c.v. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,4 (0,3 - 0,7)	0,4 (0,3 - 0,5)
Intratecal ($\mu\text{mol/sítio}$)	1,3 (0,9 - 1,8)	0,9 (0,6 - 1,4)

^aDados de Vaz *et al.* (1996).

^bDados de Beirith *et al.* (1998).

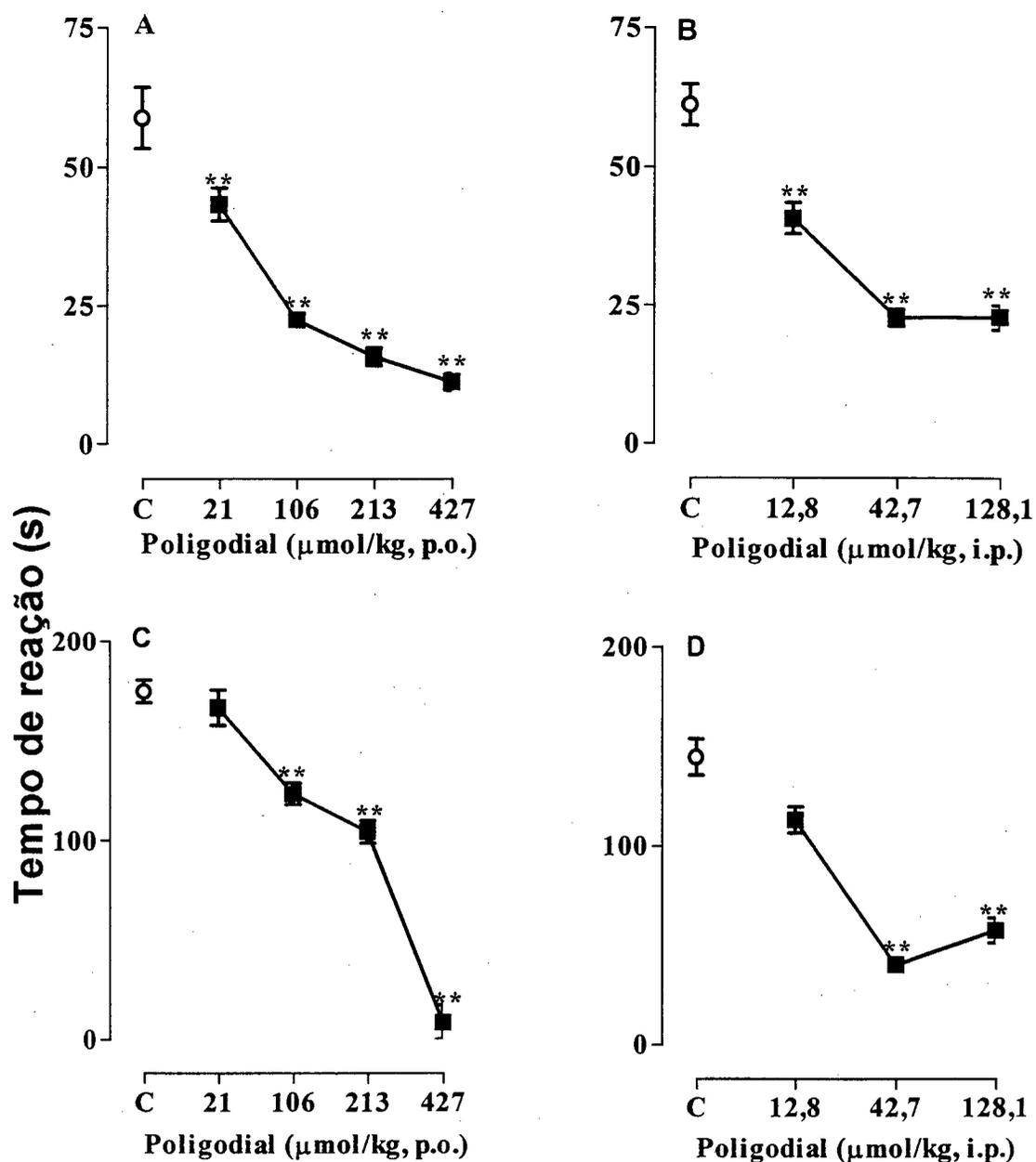


FIGURA 5. Efeitos dos tratamentos por via oral (painéis A e C) ou intraperitoneal (painéis B e D) com poligodial (12,8 - 427 µmol/kg, i.p.) analisados em relação à primeira (A) e à segunda fase (B) da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. O tempo total de reação à dor foi medido na primeira fase entre 0 e 5 min e na segunda fase entre 15 e 30 min após a injeção de formalina. Cada ponto representa a média de seis a oito animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

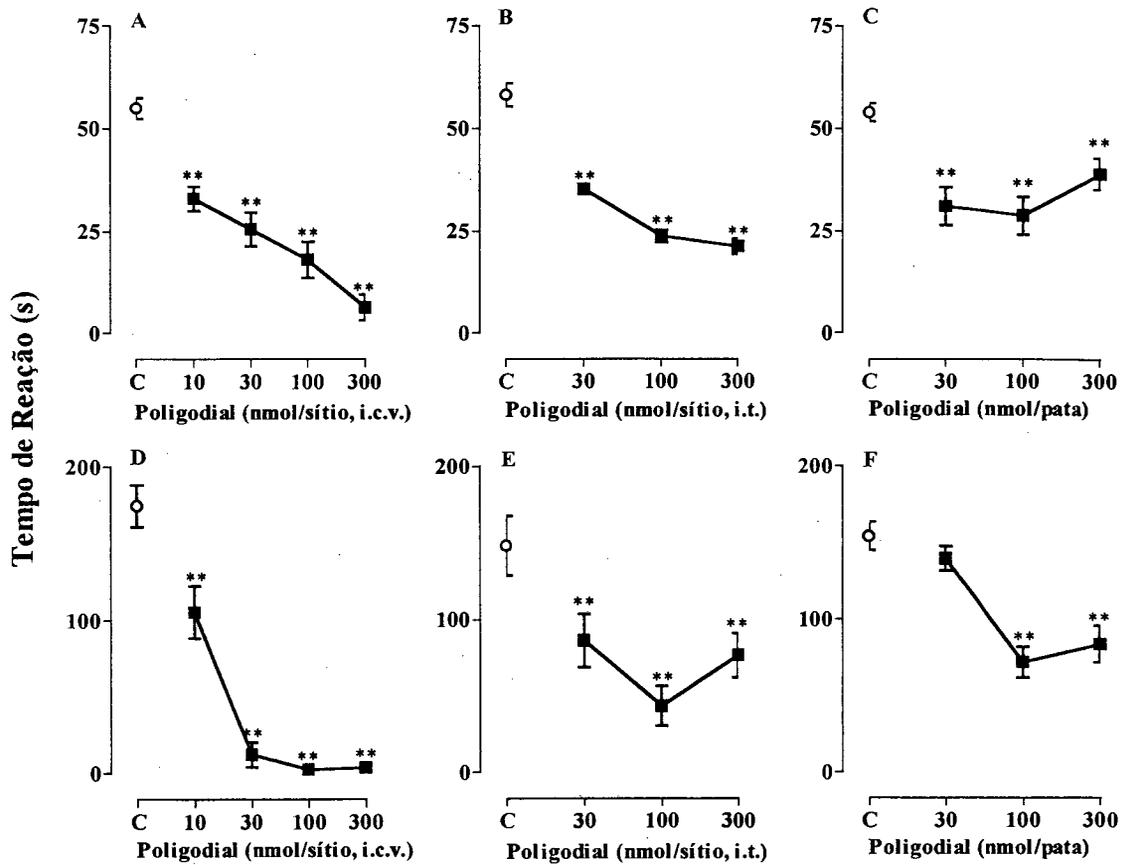


FIGURA 6. Efeitos dos tratamentos pelas vias intracerebroventricular (painéis A e D), intratecal (painéis B e E) e intraplantar (painéis C e F), com poligodial (10 - 300 nmol/sítio), analisados em relação à primeira (painel superior) e à segunda fase (painel inferior) da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. O tempo total de reação à dor foi medido na primeira fase entre 0 e 5 min e na segunda fase entre 15 e 30 min após a injeção de formalina. Cada ponto representa a média de seis a dez animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

nmol/sítio) (7 a 70,2 μ g/sítio) produziu inibição de forma dose-dependente de ambas as fases da resposta induzida pela formalina (Figura 6). Os valores das DI_{50} s foram, para a primeira fase, $\sim 100,0$ nmol/sítio, e inibição máxima (%) de $47,0 \pm 8,0$; para a segunda fase, de $93,0$ ($90,0 - 95,0$) nmol/sítio, com inibição máxima de $53,0 \pm 6,0$.

4.3 - Dor induzida pela capsaicina

Os resultados da Figura 7 (A e B) mostram que o poligodial administrado pelas vias i.p. e oral (2,1 a 128,1 μ mol/kg) (0,5 a 30 mg/kg) 30 min antes do teste causou inibição significativa e de forma dose-dependente da dor induzida pela capsaicina. Os valores médios das DI_{50} s e as inibições máximas para esses efeitos foram: 3,9 (3,6 - 4,0) e 56,9 (49,0 - 66,0) μ mol/kg, $54,0 \pm 3,0\%$ e $95,0 \pm 1,0\%$, respectivamente.

As injeções i.c.v. e i.t. de poligodial (10 a 300 nmol/sítio) (2,3 a 70,2 μ g/sítio) produziram inibição de forma dose-dependente da dor induzida pela capsaicina (Figura 7 C e D). Entretanto, considerando os valores das DI_{50} s para o poligodial, esse foi menos potente que a morfina (Tabela 2). Os valores médios das DI_{50} s calculadas (nmol/sítio) foram 32,0 (17,0 - 58,0) e 16,9 (10,6 - 27,0) para o poligodial administrado pelas referidas vias. A injeção intraplantar de poligodial (100 - 500 nmol/sítio) produziu inibição de forma dose-dependente da resposta dolorosa induzida pela capsaicina (Figura 7 E). O valor médio da DI_{50} calculada (nmol/sítio) para o poligodial foi de 316,0 (292,0 - 341,0), e a inibição máxima foi de $57,0 \pm 6,0\%$.

Tabela 2- Comparação entre os valores médios das DI_{50} s para as ações antinociceptivas do poligodial, morfina e dipirona no teste da capsaicina em camundongos.

Drogas	DI_{50}
Poligodial	
Intraperitoneal ($\mu\text{mol/kg}$)	3,9 (3,6 - 4,0)
Oral ($\mu\text{mol/kg}$)	56,9 (49,0 - 66,0)
Subplantar (nmol/pata)	316,0 (292,0 - 341,0)
I.c.v. (nmol/sítio)	32,0 (17,0 - 58,0)
Intratecal (nmol/sítio)	16,9 (10,6 - 27,0)
Morfina^a	
Subcutânea ($\mu\text{mol/kg}$)	2,6 (2,0 - 3,4)
Dipirona^b	
Intraperitoneal ($\mu\text{mol/kg}$)	207,6 (179,5 - 240,0)
i.c.v. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,14 (0,11 - 0,19)
Intratecal ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,4 (0,3 - 0,6)

^aDados de Vaz *et al.*,(1996). ^bDados de Beirith *et al.*,(1998).

4.4 - Efeito do poligodial no teste da placa quente

Conforme os resultados mostrados na Tabela 3, o tratamento dos animais com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. 30 min) não causou mudanças significativas no tempo de latência da resposta dos animais no teste da placa quente. Já, o tratamento dos animais com morfina (13.3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (5 mg/kg) 30 min antes causou potente efeito analgésico neste teste.

4.5 - Efeito do poligodial na performance motora (*rota-rod*)

Conforme os resultados mostrados na Tabela 4, o tratamento de camundongos com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. 30 min) não causou nenhum efeito significativo sobre o desempenho ou sobre o tempo de permanência dos animais no aparelho (*rota-rod*), quando analisado em diferentes intervalos de tempo e comparado com o grupo-controle (salina).

4.6 - Efeito do poligodial na hiperalgesia induzida pelo glutamato

O poligodial (42,7 e 128,1 $\mu\text{mol/kg}$), administrado pela via intraperitoneal 30 min antes, não afetou a hiperalgesia induzida pela administração de glutamato por via i.t. em camundongos avaliados no teste da placa quente. As respostas-controle no teste da placa, nos tempos de 5 a 60 min, não foram diferentes daquelas em presença do poligodial (Figura 8).

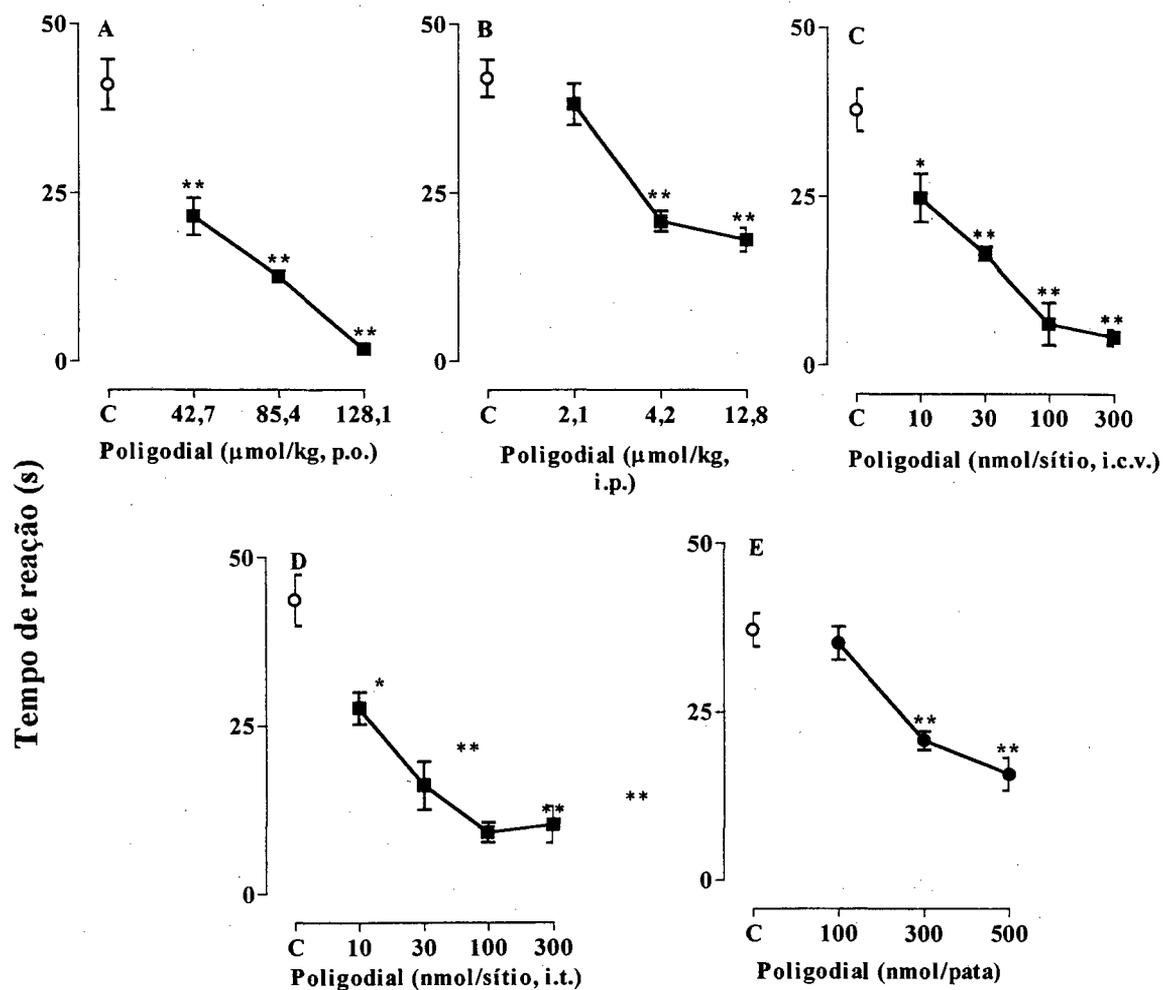


Figura 7. Efeitos dos tratamentos por via oral (A), intraperitoneal (B), intracerebroventricular (C), intratecal (D) e intraplantar (E), com poligodial analisados em relação à dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. O tempo total de reação à dor foi medido durante 5 min após a injeção de capsaicina. Cada ponto representa a média de seis a oito animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$.

Tabela 3 - Efeito do tratamento com morfina (s.c.) ou com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) no teste da placa quente em camundongos.

Drogas	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Latência
		Placa quente
Controle	0	6,6 \pm 0,6
Morfina	13,3	24,0 \pm 1,5 ^{***}
Poligodial	42,7	9,7 \pm 0,9

Cada grupo representa a média \pm EPM de seis a dez animais. Difere significativamente do valor-controle. (Análise de Variância) ^{***} $P < 0,01$.

Tabela 4 - Efeito do tratamento com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) em relação à performance motora dos camundongos no teste do *rota rod*.

Tratamento	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Performance no <i>rota rod</i> (s)		
		Tempo após o tratamento (min)		
		15	30	60
Controle	0	54,8 \pm 5,1	52,5 \pm 7,5	60,0 \pm 0,0
Poligodial	42,7	60,0 \pm 0,0	60,0 \pm 0,0	54,6 \pm 3,3

Cada grupo representa a média \pm EPM de oito animais.

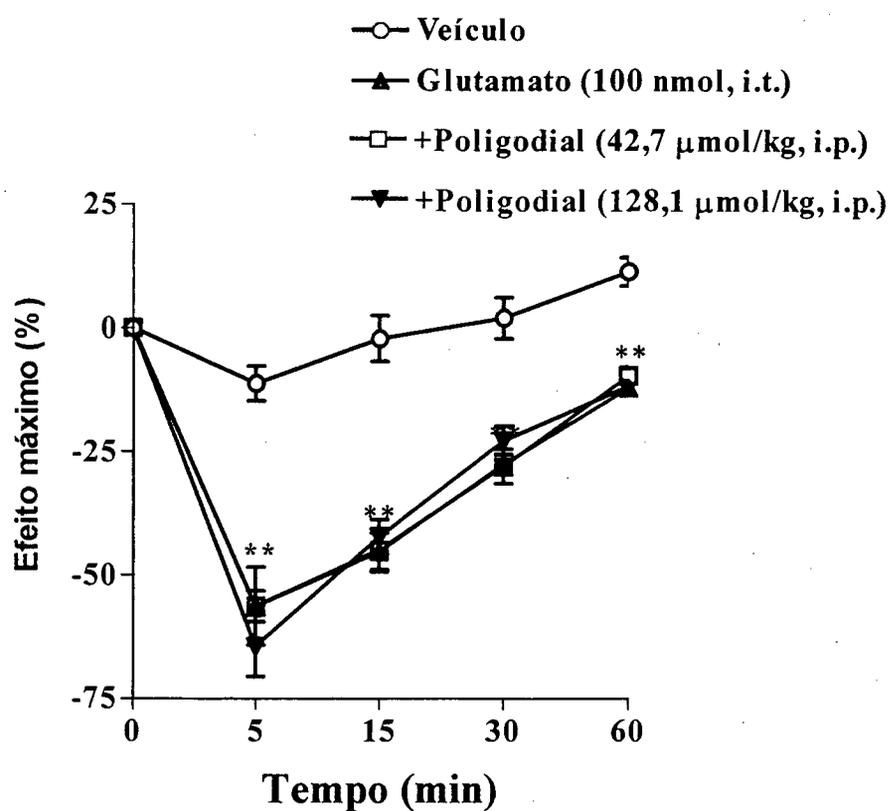


Figura 8. Efeito do tratamento com poligodial (42,7 ou 128,1 µmol/kg,) administrado por via intraperitoneal na hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato avaliado no teste da placa quente. Cada ponto representa a média de oito animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente do grupo-controle, ** $P < 0,01$.

4.7- Mecanismo de ação analgésica do poligodial

4.7.1 - Influência do pré-tratamento com naloxona

Os resultados apresentados na Figura 9, demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (5 mg/kg), um antagonista opióide não-seletivo, causou reversão quase que completa da resposta antinociceptiva induzida pela morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) e pelo poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisado no modelo da dor induzido pela formalina.

4.7.2 - Influência do pré-tratamento com ioimbina e prazosin

Conforme ilustrado na Figura 10, o pré-tratamento dos animais com os antagonistas dos adrenoceptores α_1 (prazosin, 0,35 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,15 mg/kg) e α_2 (ioimbina, 0,38 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,15 mg/kg) causou reversão da atividade antinociceptiva induzida pelo agonista seletivo α_1 (fenilefrina, 49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (10 mg/kg) ou seletivo α_2 (clonidina, 3,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (0,1 mg/kg), quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Da mesma forma, o efeito analgésico do poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) foi antagonizado de forma significativa apenas pelo antagonista adrenérgico α_1 , quando analisado na nocicepção induzida pela formalina.

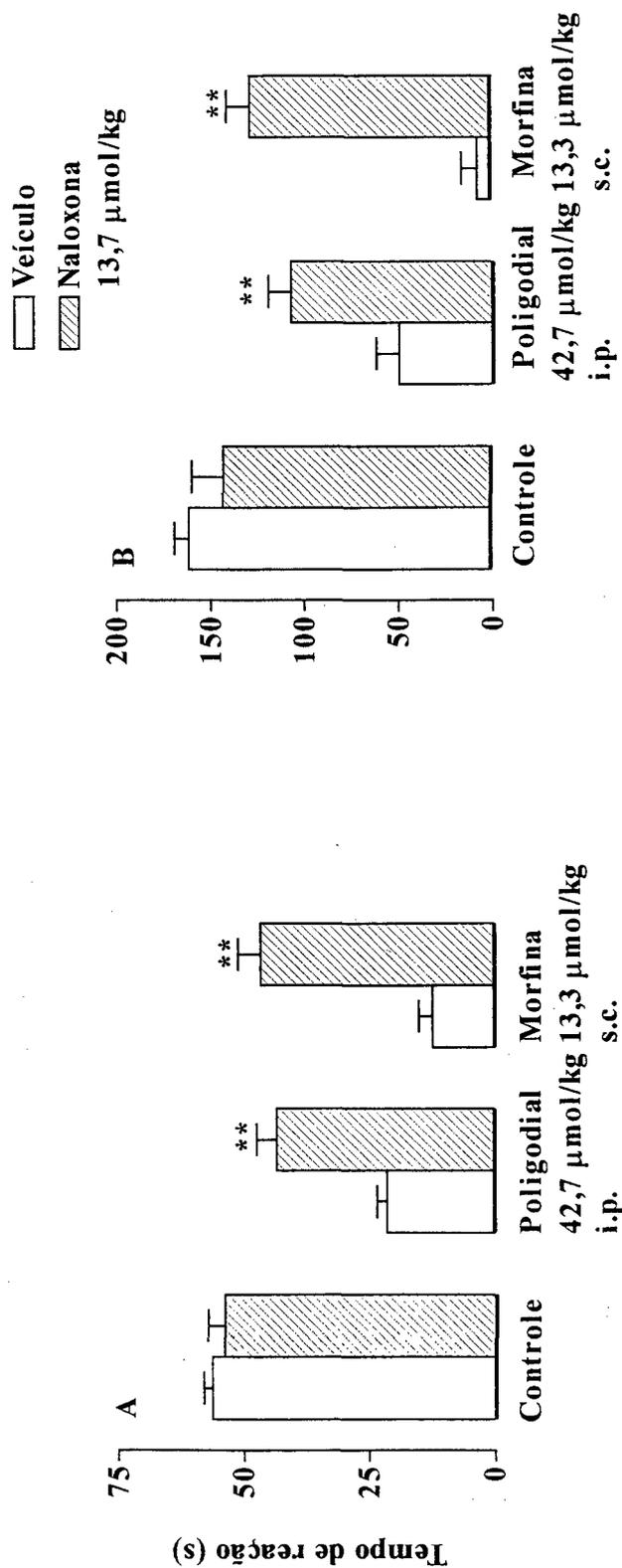


Figura 9. Influência do pré-tratamento com naloxona (13,7 µmol/kg, i.p., 15 minutos antes) na antinociceção produzida pela morfina (13,3 µmol/kg, s.c.) ou pelo poligodol (42,7 µmol/kg, i.p. 30 min), analisado em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Cada coluna representa a média de seis a doze animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

■ Veículo
 ▨ Prazosin (0,35 μmol/kg, i.p.)
 □ Ioimbina (0,38 μmol/kg, i.p.)

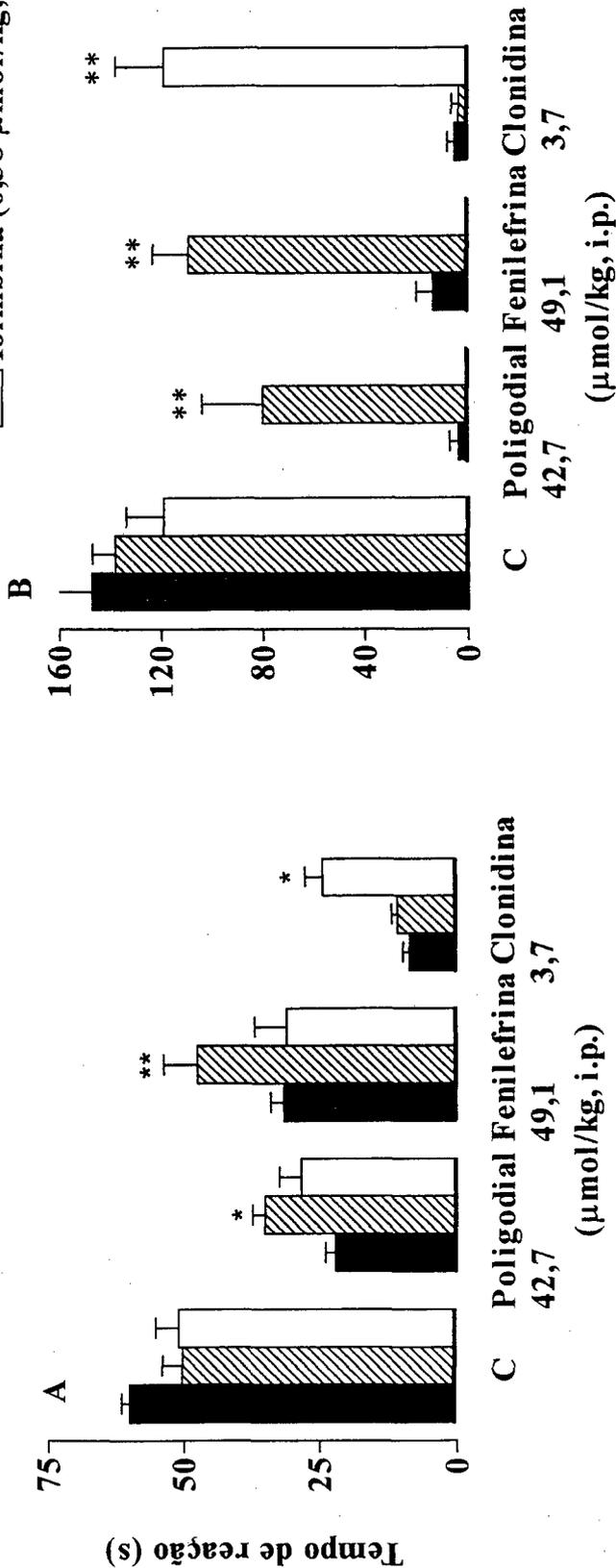


Figura 10. Influência do pré-tratamento com prazosin ou com ioimbina sobre a antinociceção produzida pelo poligodol (42,7 μmol/kg, i.p.), fenilefrina ou pela clonidina, analisado em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada coluna representa a média de quatro a dez animais e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.7.3 - Influência do pré-tratamento com L-arginina

Conforme mostrado na Figura 11, o pré-tratamento dos animais com L-arginina (3,5 mmol/kg, i.p.) (10 mg/kg) reverteu completamente a ação antinociceptiva causada pela administração de L-NOARG (342 μ mol/kg, i.p.) (75 mg/kg). O mesmo tratamento com L-arginina, por outro lado, não interferiu na ação antinociceptiva causada pelo poligodial (42,7 μ mol/kg, i.p.), analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina.

4.7.4 - Influência do pré-tratamento com bicuculina e faclofen

Os resultados da Figura 12 mostram que o pré-tratamento dos animais com bicuculina (1,9 μ mol/kg, i.p.) (1 mg/kg) ou com faclofen (40 μ mol/kg, i.p.) (10 mg/kg), antagonistas, respectivamente, de receptores GABA_A e GABA_B, reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo baclofen (agonista de receptores GABA_B, 4,6 μ mol/kg, i.p.) (1 mg/kg) e pelo muscimol (agonista de receptores GABA_A, 8,7 μ mol/kg, i.p.) (1 mg/kg). No entanto, o mesmo tratamento dos animais com bicuculina e o faclofen não alterou significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo composto poligodial (42,7 μ mol/kg, i.p.), quando analisado em relação à nocicepção causada pela formalina.

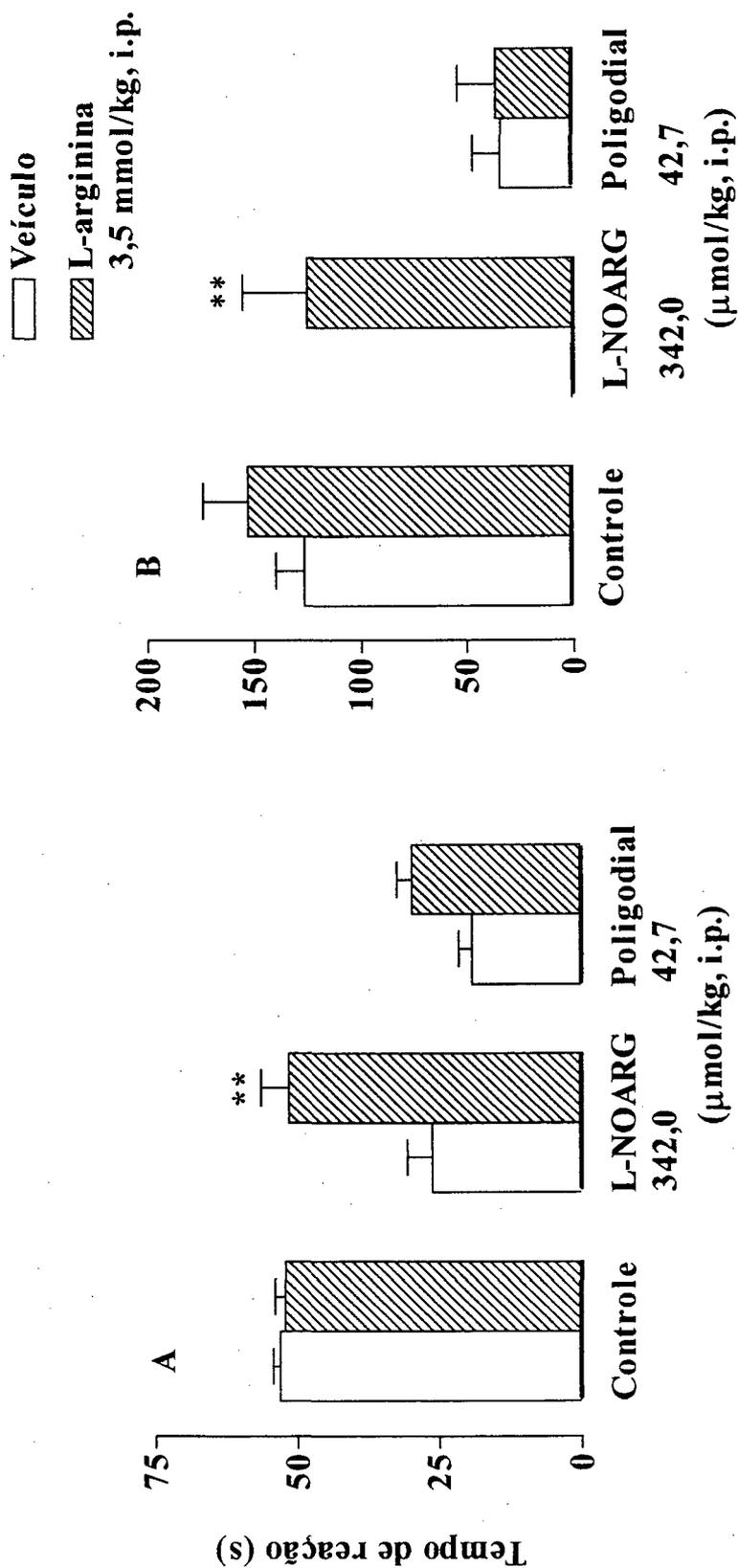


Figura 11. Influência do pré-tratamento com L-arginina (3,5 mmol/kg, i.p., 15 min antes) na antinociceção produzida pela L-NOARG ou pelo poligodol (42,7 μmol/kg, i.p.) analisado em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada coluna representa a média de quatro a seis animais, e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

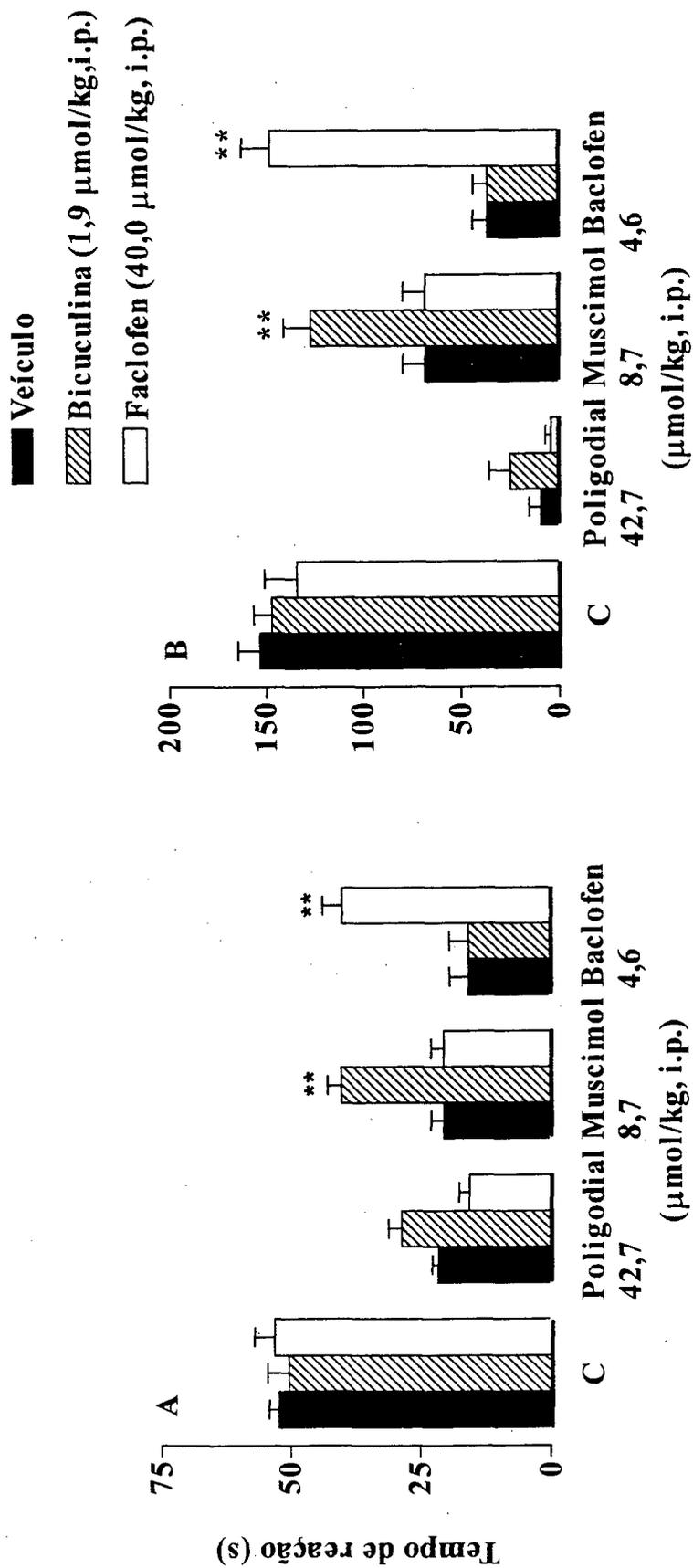


Figura 12. Influência do pré-tratamento com bicuculina ou baclofen na antinociceção produzida pelo poligodial (42,7 μmol/kg, i.p.), muscimol e baclofen, analisado em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada coluna representa a média de quatro a oito animais e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

4.7.5 - Influência do pré-tratamento com PCPA

O pré-tratamento dos camundongos com p-clorofenilalanina (399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) (100 mg/kg), administrado uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos e, no último dia, 30 min antes do composto poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), alterou significativamente a ação antinociceptiva do composto na segunda, mas não na primeira fase da dor induzida pela formalina (Figura 13).

4.7.6 - Influência do pré-tratamento com toxina pertussis

O pré-tratamento dos animais com a toxina pertussis (inativador de proteína G_i , 1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v. sete dias antes) causou uma inibição significativa da antinocicepção causada pela morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), bem como aquela causada pelo poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (Figura 14).

4.7.7 - Influência do pré-tratamento com glibenclamida

De acordo com a Figura 15, a glibenclamida (bloqueador de canal de K_{ATP} , 81 nmol/sítio, i.c.v.) não modificou significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisado em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina. Nas mesmas condições a glibenclamida antagonizou significativamente a antinocicepção causada pela morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.).

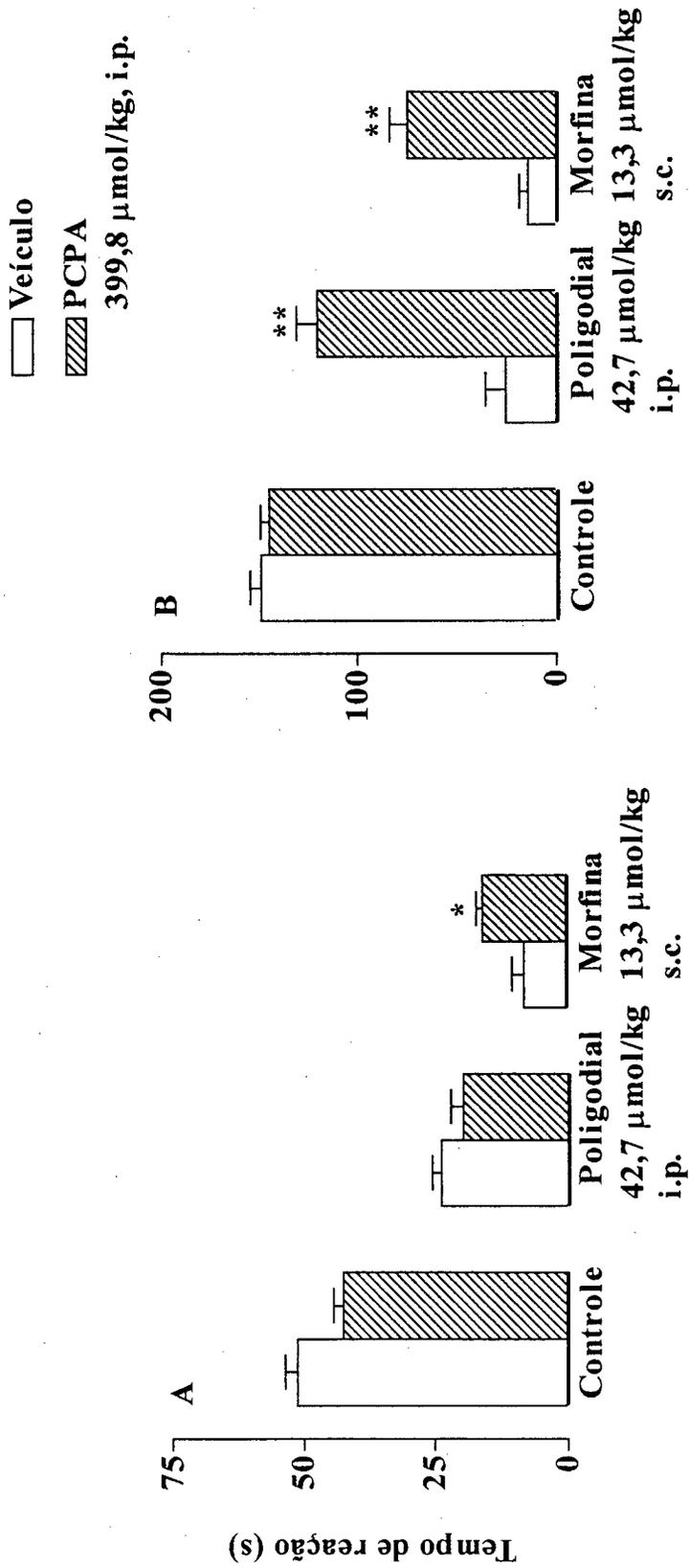


Figura 13. Influência do pré-tratamento por quatro dias consecutivos com p-clorofenilalanina na antinociceção produzida pelo poligodial (42,7 μmol/kg, i.p.) ou pela morfina (13,3 μmol/kg, s.c.), analisado em relação à primeira (A) e à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada coluna representa a média de quatro a oito animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

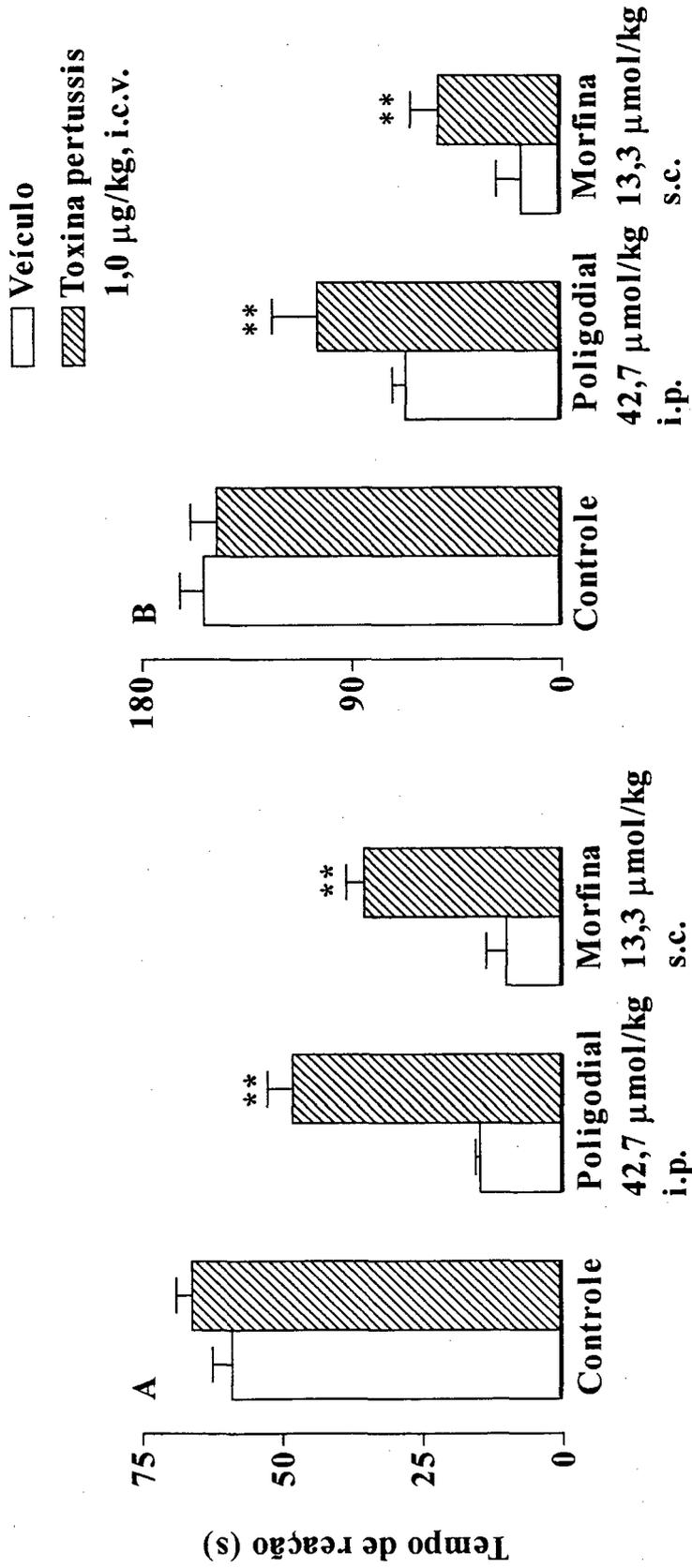


Figura 14. Efeito do pré-tratamento i.c.v. com toxina pertussis (1 µg/site, sete dias antes) na antinocicepção produzida pela morfina (13,3 µmol/kg, s.c.) ou pelo poligodol (42,7 µmol/kg, i.p.), analisado em relação à primeira (A) e à segunda (B) fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Cada coluna representa a média de quatro a dez animais e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

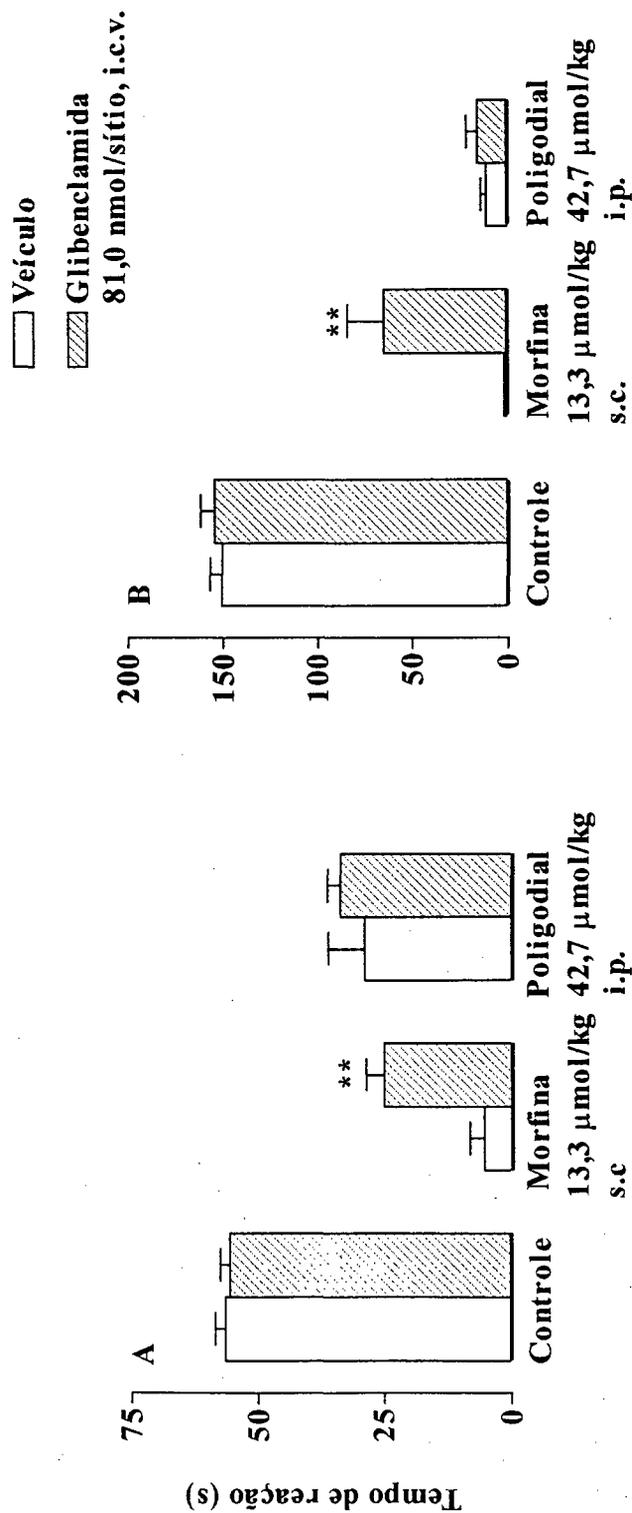


Figura 15. Efeito do pré-tratamento com glibenclamida i.c.v. (1 µg/sítio, 15 minutos antes) na antinociceção produzida pela morfina (13,3 µmol/kg, s.c.) e poligodial (42,7 µmol/kg, i.p.), analisado em relação à primeira (A) e à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Cada coluna representa a média de oito a doze animais e as barras verticais indicam os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.

4.7.8 - Influência da adrenalectomia

Conforme mostram os resultados da Tabela 5 os animais adrenalectomizados bilateralmente, tratados com poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. 30 min), não apresentaram nenhuma alteração da atividade antinociceptiva para esse composto, quando comparados com os animais-controle (falso operados) e testados em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina.

Tabela 5 - Efeito antinociceptivo do composto poligodial em camundongos-controle (falso operados) ou adrenalectomizados (ADX) em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina.

Droga	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Tempo de reação (s)			
		Primeira fase		Segunda fase	
		0-5 min		15-30 min	
		ADX	Controles	ADX	Controles
Controle	0	51,5 \pm 1,1	56,3 \pm 3,1	145 \pm 15,0	149 \pm 22,8
Poligodial	42,7	18,7 \pm 1,8**	28,0 \pm 1,8**	4,7 \pm 1,0**	2,7 \pm 2,7**

Cada grupo representa a média \pm EPM de quatro a seis animais.

** $P < 0,1$ comparado com o grupo-controle.

4.7.9 - Tolerância cruzada entre as ações antinociceptivas da morfina e do poligodial no teste da formalina

Os resultados mostrados na Figura 16 indicam que a morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) e o poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) foram eficazes em produzir antinocicepção no teste da formalina em animais não tolerantes à morfina. Por outro lado, os animais que receberam morfina durante sete dias consecutivos desenvolveram tolerância aos efeitos da mesma, mas não apresentaram tolerância cruzada ao poligodial, quando testado em relação a ambas as fases da dor no modelo da formalina.

4.8 - Edema de pata em camundongos

Os resultados apresentados na Fig 17 mostram que o tratamento com poligodial (12,8 a 128,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) foi capaz de inibir de forma dose-dependente os edemas de pata induzidos pela BK (3 nmol/pata), carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$) ou dextrana (100 $\mu\text{g/pata}$). As doses inibitórias médias observadas (DI_{50} $\mu\text{mol/kg}$, juntamente com o limite de confiança para 95%) para o poligodial foram: BK (86,3; 55,6 - 133,9), carragenina (31,6; 24,8 - 37,7) e dextrana (16,9; 12,6 - 22,6). As inibições máximas obtidas foram: BK (69,0 \pm 9,9%), carragenina (64,7 \pm 6,6%) e dextrana (92,0 \pm 3,8%).

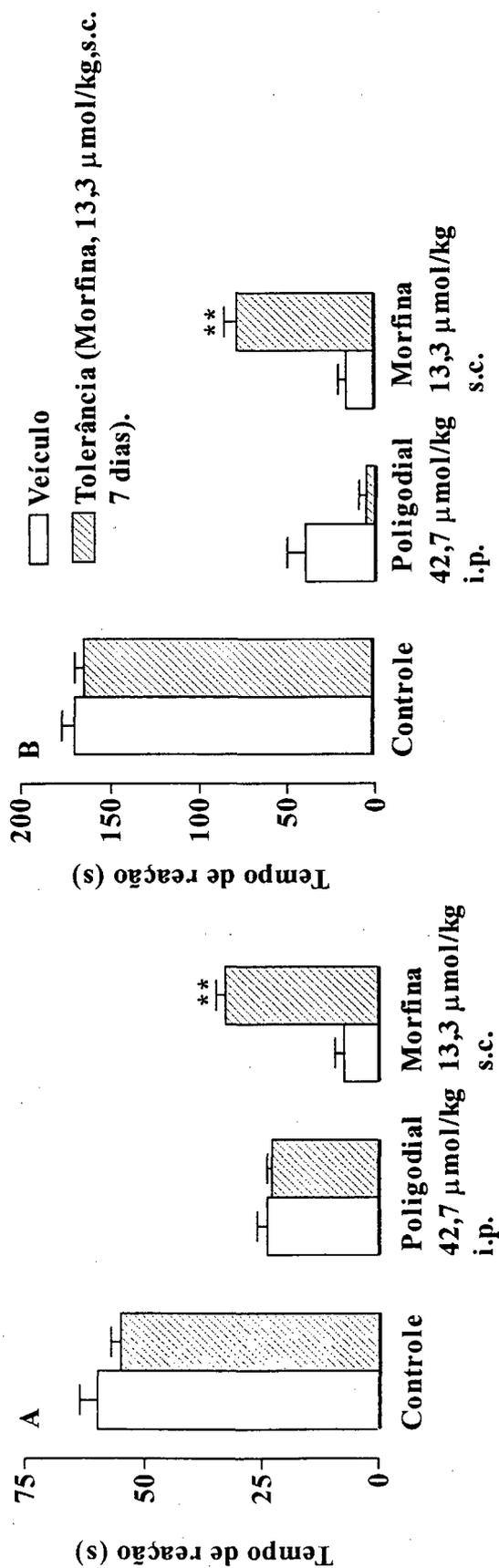
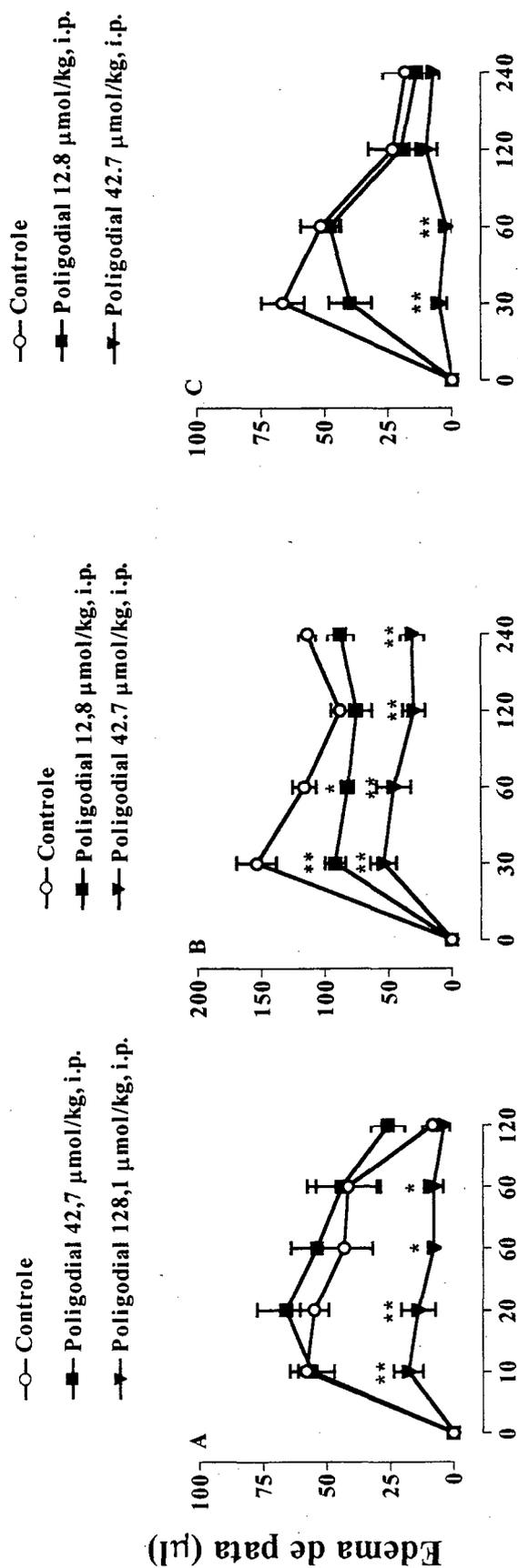


Figura 16. Influência do pré-tratamento com morfina (13,3 µmol/kg, s.c. durante sete dias) na antinociceção produzida pelo poligodol (42,7 µmol/kg, i.p.) ou a morfina, analisado em relação à primeira (A) e à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de quatro a oito animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, ** $P < 0,01$.



Tempo após a injeção (min)

Figura 17. Efeitos dos tratamentos com poligodial administrado intrapentonealmente sobre os edemas de pata induzidos em camundongos pela injeção intraplantar de BK, (3 nmol/pata, A), carragenina, (300 µg/pata, B) e dextrana (100 µg/pata, C). O edema de pata resultante da utilização dos indutores foi medido pletoisometricamente entre 10 e 120 (BK) e 30 e 240 (carragenina e dextrana) minutos após a injeção intraplantar das substâncias. Cada ponto representa a média de cinco a sete animais e as barras verticais os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

De acordo com a Figura 18, a injeção intraplantar de PLA₂ causou edema de pata em camundongos, cujo pico máximo ocorreu em torno de 30 minutos. O tratamento dos animais com poligodial administrado intraperitonealmente, nas doses de 42,7 e 128,1 $\mu\text{mol/kg}$, produziu inibição significativa e dose-dependente do edema com DI₅₀ estabelecida de 73,1 (54,8 - 97,6) $\mu\text{mol/kg}$ e inibição máxima de $65,4 \pm 3,8\%$.

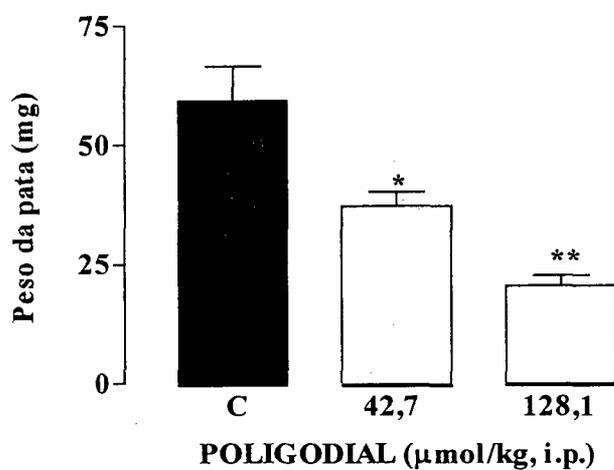


Figura 18. Efeitos do tratamento com poligodial (42,7 ou 128,1 $\mu\text{mol/kg}$,) por via intraperitoneal sobre o edema de pata induzido pela PLA₂, 5 U/pata em camundongos. O edema de pata resultante da utilização de PLA₂ foi medido pelo peso das patas no tempo de 30 min após a injeção intraplantar da substância. Cada coluna representa a média de cinco a sete animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente do grupo-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Os resultados mostrados na Figura 19 indicam que o tratamento com poligodial (12,8 a 128,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. 30 min) foi capaz de inibir de forma dose-dependente edemas de pata induzidos pela PGE₂ (30 nmol/pata) e SP (20 nmol/pata). As doses inibitórias médias observadas (DI₅₀, $\mu\text{mol/kg}$, juntamente com o limite de confiança 95%) foram: PGE₂ 107,2 (86,8 - 132,4) e SP 82,8

(68,7 - 100,3). As inibições máximas obtidas foram: PGE₂ (62,4 ± 6,2%) e SP (75,7 ± 6,6%).

4.9 - Edema de orelha em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram que o tratamento com poligodial (42,7 a 427,0 µmol/kg, i.p. 30 min) inibiu de maneira dose-dependente edemas de orelha induzidos pelo AA (2 mg/orelha), capsaicina (250 µg/orelha) ou óleo de cróton (1 mg/orelha). As doses inibitórias médias observadas (DI₅₀, µmol/kg, juntamente com o limite de confiança 95%) foram: AA 141,3 (101,0 - 197,7) e capsaicina 169,0 (153,0 - 187,0). As inibições máximas obtidas foram: AA (73,4 ± 4,8%); capsaicina (58,0 ± 10,0%) e óleo de cróton (44,0 ± 5,0%).

4.10 - Efeito do poligodial na pleurisia induzida por carragenina

A Figura 21 demonstra os efeitos do poligodial (12,8 a 128,1 µmol/kg) administrado por via i.p. 30 min antes do agente flogístico (carragenina, 1 mg/cavidade), na primeira fase do processo inflamatório (4 h). Foi possível observar que o poligodial causou inibição significativa no influxo celular de leucócitos para a cavidade pleural, representado principalmente por neutrófilos, tendo maior atividade quando utilizado na dose de 42,7 µmol/kg. O

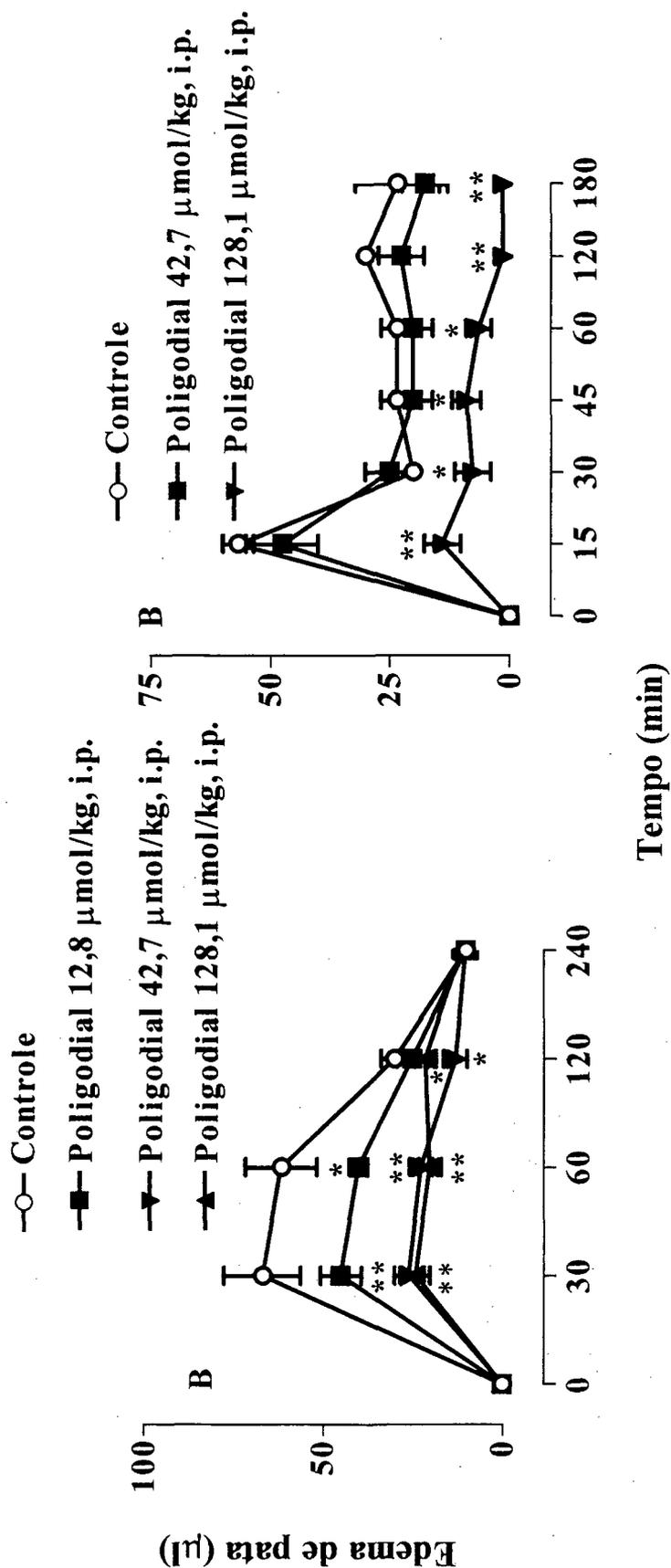


Figura 19. Efeitos dos tratamentos com poligodol (12,8 - 128,1 µmol/kg, 30 min) por via intraperitoneal sobre os edemas de pata induzidos em camundongos por PGE₂ (A) (30 nmol/pata) e substância P (B) (20 nmol/pata). O edema de pata resultante da utilização dos indutores foi medido através de pletismometria nos tempos de 30 a 240 min (A) e 15 a 180 min (B) após a injeção intraplantar das substâncias. Cada ponto representa a média de cinco a oito animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

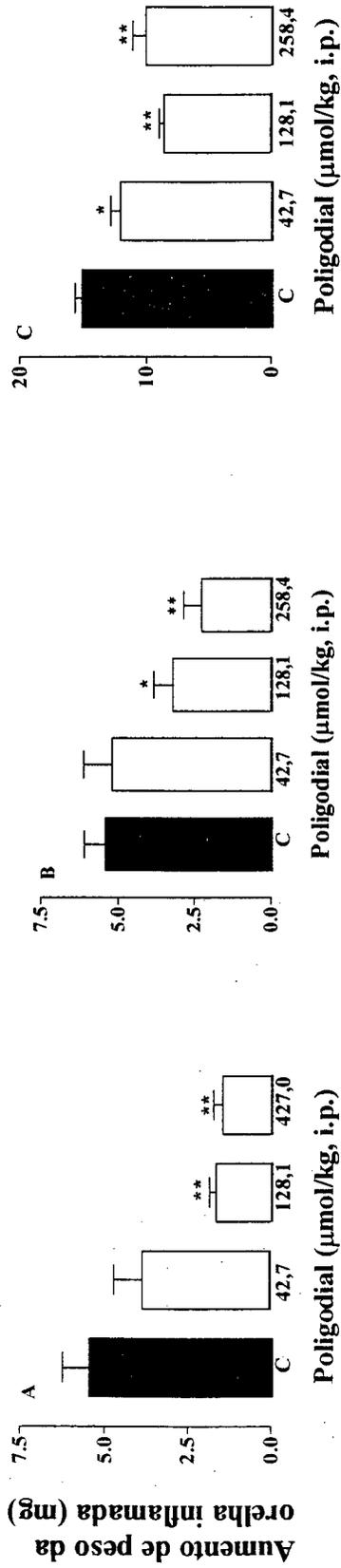


Figura 20. Efeitos dos tratamentos com poligodial (42,7 - 427,0 μmol/kg,) por via intraperitoneal sobre os edemas de orelha induzidos em camundongos por ácido araquidônico (A) (2 mg/orelha), capsaicina (B) (250 μg/orelha) e óleo de crêton (C) (1 mg/orelha). A resposta edematogênica foi avaliada através da diferença de peso (mg) entre a orelha que recebeu o indutor de edema e a orelha contralateral que recebeu apenas o veículo para diluir o indutor. Cada coluna representa a média de quatro a oito animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos- controle, * < 0,05 e ** $P < 0,01$.

tratamento prévio (30 min) dos animais com poligodial causou efeito inibitório na migração celular, mas não na exsudação, em relação à primeira fase da reação inflamatória.

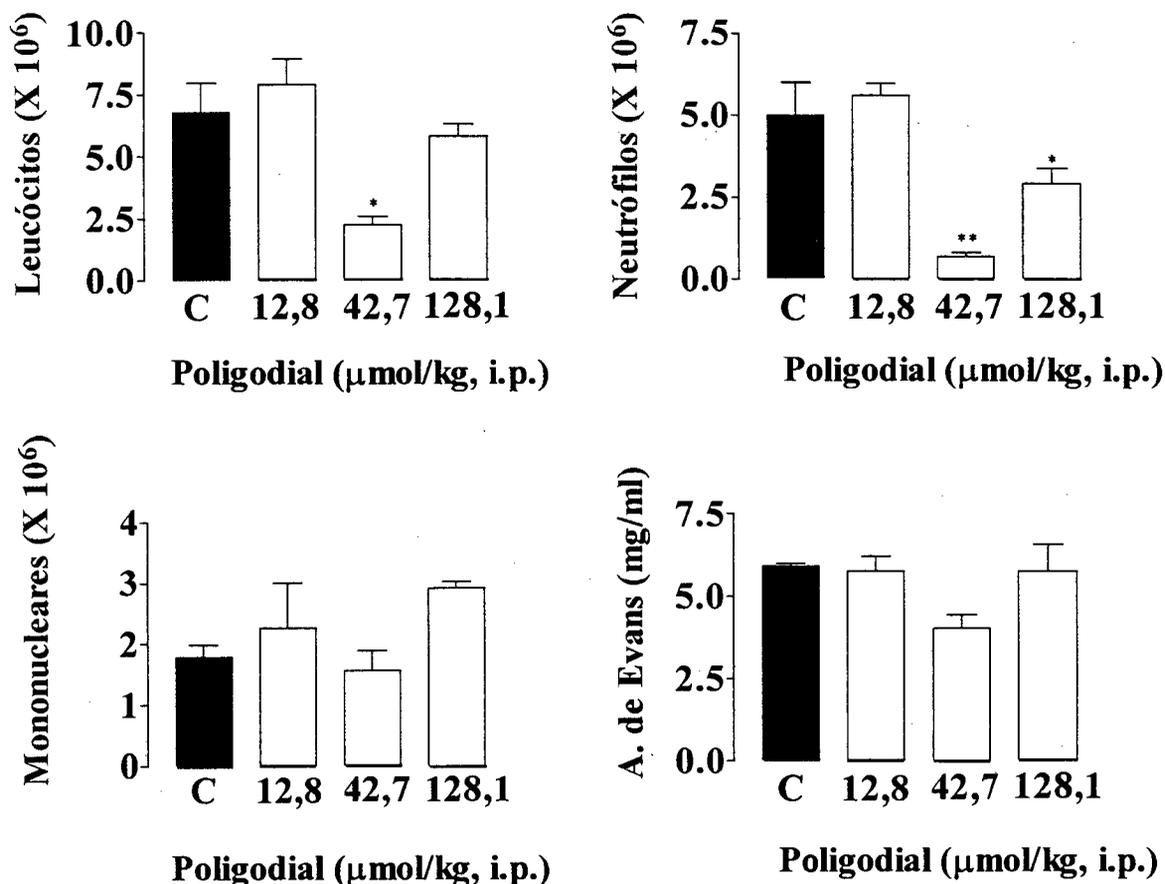


Figura 21. Efeitos do tratamento com poligodial (12,8 - 128,1 $\mu\text{mol/kg}$.) administrado por via intraperitoneal na pleurisia induzida em camundongos pela carragenina (1%), 1 mg/cavidade pleural. A migração celular e o extravasamento de azul de Evans foram medidos 4 horas após a administração de carragenina. Cada coluna representa a média de quatro a seis animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.11 - Efeito do poligodial no choque anafiiático em camundongos sensibilizados pela ovoalbumina

Os resultados apresentados na Figura 22 (A) demonstram o perfil temporal do poligodial (42,7 $\mu\text{mol/kg}$) administrado 48, 24, 12, 6, 3 e 1 hora antes da administração de ovoalbumina (500 $\mu\text{g/kg}$, i.v.) em animais que foram ativamente sensibilizados ao antígeno. Nos animais previamente tratados com poligodial, observou-se, entre 6 e 12 horas, proteção total de morte, efeito esse que atingiu 50% quando o composto foi administrado 48 horas antes. Com relação à dexametasona, houve cerca de 100% de proteção dos animais quando a mesma for administrada na dose de 2 mg/kg, s.c., 6 ou 12 horas antes da indução do choque anafilático (Figura 22 B). No grupo dos animais-controle, houve 30% de sobreviventes à administração do antígeno.

4.12 - Efeito do poligodial no edema alérgico em ratos sensibilizados pela ovoalbumina.

Os resultados mostrados na Figura 23 evidenciam que a injeção intraplantar de ovoalbumina (6 $\mu\text{g/pata}$) causou edema de pata em ratos sensibilizados ao antígeno. O tratamento dos animais com poligodial (4,2 - 42,7 $\mu\text{mol/k}$, i.p.) produziu inibição significativa e de maneira dose-dependente do edema, com DI_{50} calculada de 26,0 (18,3 - 36,9) $\mu\text{mol/kg}$ e inibição máxima (média \pm EPM.) de $61,6 \pm 4,8\%$.

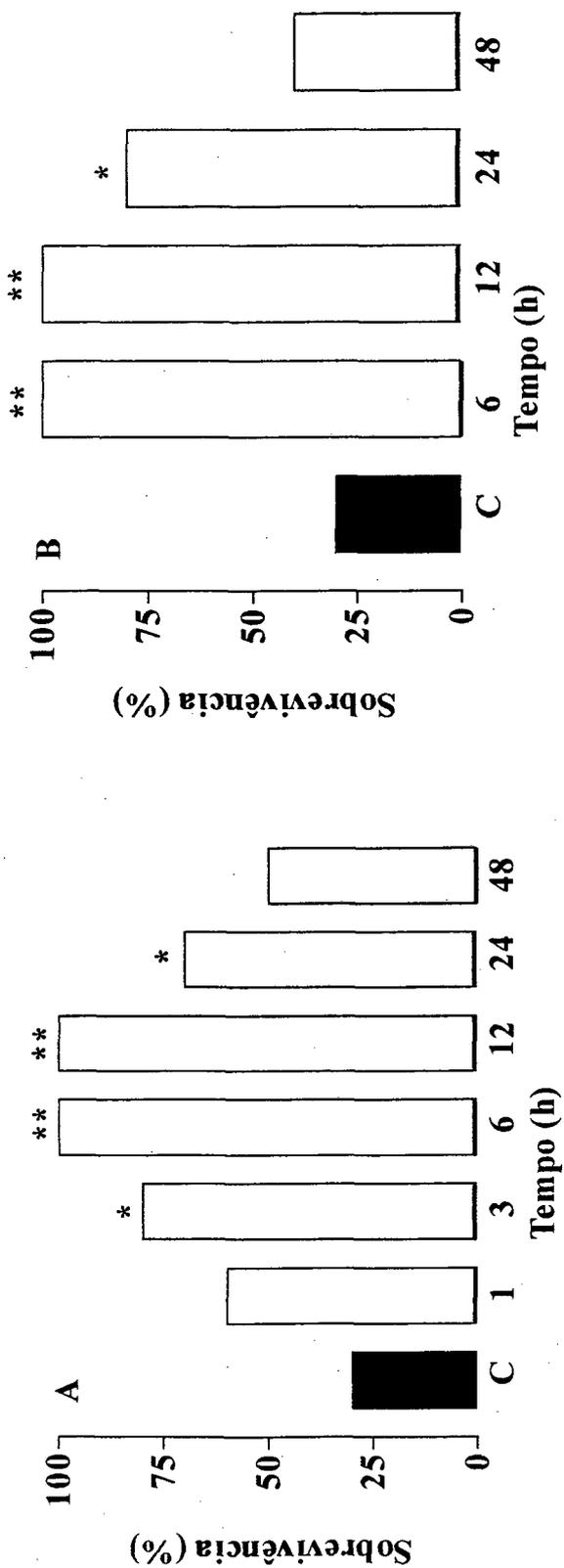


Figura 22. Efeito antialérgico do poligodol (42,7 µmol/kg, i.p.) (A) e da dexametasona (2 mg/kg, s.c.) (B) sobre o choque anafilático induzido pela ovoalbumina (500 µg/kg, i.v.) em camundongos ativamente sensibilizados ao antígeno. Cada coluna representa a média de oito a dez animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente dos grupos-controle, * $P < 0,05$ e ** $P > 0,01$, teste de qui-quadrado.

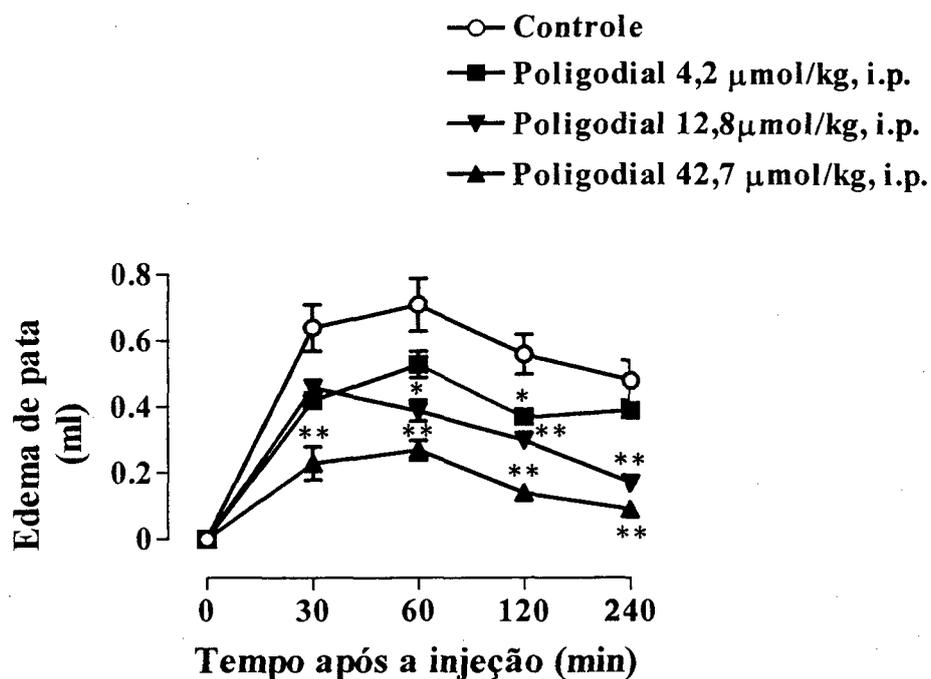


Figura 23. Efeito do tratamento com poligodial (4,2 - 42,7 $\mu\text{mol/kg}$.) administrado intraperitonealmente sobre o edema alérgico de pata em ratos, induzido por 6 μg de ovoalbumina em animais sensibilizados. O edema de pata resultante foi medido pletismometricamente entre 30 e 240 minutos após a injeção do antígeno. Cada ponto representa a média de três a cinco animais, e as barras verticais, os EPM. Difere significativamente do grupo-controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5 - DISCUSSÃO

O presente estudo analisou as propriedades antinociceptivas, antiinflamatórias e antialérgicas do composto poligodial, além de investigar o possível mecanismo de ação antinociceptiva do referido composto.

O modelo das contorções abdominais é um modelo considerado relativamente com pouca especificidade, de observação inequívoca, relativamente simples, rápido e sensível a fármacos analgésicos e antiinflamatórios não-esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos de ação central. Os resultados obtidos nesse modelo apresentam boa correlação com a potência das drogas analgésicas em outros modelos pré-clínicos (Blane, 1967; Blumberg *et al.*, 1965; Siegmund *et al.*, 1957a, b; Taber *et al.*, 1964). Nesse modelo, demonstramos que o poligodial, quando administrado por via i.p. 30 min antes, produziu uma inibição quase completa e de forma dose-dependente das contorções abdominais provocadas por três irritantes químicos, o ácido acético, o caolim e o zimosan. O poligodial foi 14 a 27 vezes mais potente que o EH de *D. winteri* também testado nesses modelos e condições (Mendes *et al.*, 1998). Foi postulado por Whittle (1964) que o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos da dor, incluindo a BK, 5-HT, histamina e as PGs. Por outro lado, tem sido postulado que a nocicepção induzida pelo caolim está estritamente relacionada à liberação de cininas, e que a dor derivada é altamente sensível às drogas que interagem com a liberação e/ou ações dessas substâncias (Fujiyoshi *et al.*, 1989; De Campos *et al.*, 1996; Corrêa *et al.*, 1996). Ao

contrário, o zimosan, um produto celular do *Saccharomyces cerevisiae*, é uma potente substância pró-inflamatória que atua através da ativação do sistema complemento, além da liberação de citocinas, tais como IL-1 e TNF α (Czop, 1986; Beutler e Cerami, 1986). Portanto, a dor abdominal induzida pelo zimosan, usualmente, não é sensível aos antagonistas das cininas (Corrêa *et al.*, 1996; De Campos *et al.*, 1996;), ao passo que as respostas induzidas pelo ácido acético podem ser prevenidas por drogas antiinflamatórias não esteroidais (Whittie, 1964).

No teste da formalina, descrito por Dubuisson e Denis (1977) em ratos e gatos, e que vem sendo sistematicamente empregado para o estudo de drogas analgésicas em roedores, especialmente em camundongos (Tjølsen *et al.*, 1992; Rosland, 1991), o animal recebe uma injeção i.p. de formalina na pata posterior, o que desencadeia um processo doloroso caracterizado por batidas, lambidas e/ou mordidas. Observam-se duas fases distintas: nos primeiros 5 minutos, uma fase inicial (fase neurogênica), caracterizada pela estimulação de nociceptores por fibras aferentes do tipo C (Hunskaar *et al.*, 1985; Dubuisson e Dennis, 1977), associada à liberação de adenosina, BK, glutamato e SP; uma fase tardia (fase inflamatória) com duração de 15 a 30 minutos (Hunskaar e Hole, 1987; Malmberg e Yaksh, 1992; Malmberg *et al.*, 1994; Hong e Abbott, 1995), quando mediadores, tais como adenosina, BK, histamina, PGs e 5-HT, estão presentes (Hunskaar e Hole, 1987; Shibata *et al.*, 1989; Corrêa e Calixto, 1993; Reeve e Dickenson, 1995).

No teste da formalina, o poligodial apresentou significativa ação antinociceptiva, quando administrado pelas vias oral, i.p., i.pl., i.t., e i.c.v. em relação a ambas as fases da dor, à formalina. Nossos resultados mostraram que dependendo da via de administração, o poligodial foi cerca de 4 a 57 vezes mais potente que a aspirina e a dipirona; porém, foi cerca de 5 a 155 vezes menos potente que a morfina (Vaz *et al.*, 1996; Beirith *et al.*, 1998). O poligodial produz antinocicepção local e sistêmica, além de antinocicepção espinhal e supra-espinhal. Conforme resultados obtidos em relação ao edema de pata associado com a segunda fase da dor induzida pela formalina, o composto nas mesmas doses, as quais revelaram ações antinociceptivas, não foi capaz de interferir no edema de pata associado à injeção i.pl. de formalina, embora tenha inibido o edema de pata induzido por outros mediadores. As evidências experimentais demonstram que o edema de pata, associado com a segunda fase da dor à formalina, resulta da liberação de vários mediadores químicos, como as cininas, AAE, NO e PGE₂ (Yamamoto e Yaksh, 1992; Coderre e Melzack, 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Mamiberg e Yaksh, 1994, 1995; Corrêa *et al.*, 1996), mas não de TKs (Santos e Calixto, 1997).

Utilizamos também o poligodial no teste da capsaicina, no qual composto demonstrou atividade antinociceptiva pelas vias oral, i.p., i.t., i.c.v. e i.pl. A capsaicina é uma amida neurotóxica isolada de plantas do gênero *Capsicum*, que, quando injetada na região plantar da pata posterior de camundongos, causa dor intensa, caracterizada por mordidas e lambidas na pata injetada, efeito que está relacionado com a dor de origem neurogênica (Sakurada *et*

al., 1993; Santos e Calixto, 1997). Assim, a capsaicina representa um modelo experimental interessante para o estudo de drogas antinociceptivas, porque permite estudar dor de origem neurogênica (Sakurada *et al.*, 1992; 1993) e evidenciar a participação de vários mediadores químicos, como AAE, cininas, NKs e NO, no processo doloroso (Sakurada *et al.*, 1992; Wiertelak *et al.*, 1994; Corrêa *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998). A capsaicina ativa uma distinta subpopulação de neurônios primários sensoriais, com corpos celulares na raiz dorsal, gânglios nodoso e trigeminal. Esses neurônios transmitem informação nociceptiva para o sistema nervoso central (função aferente), ao passo que suas terminações periféricas são sítios de liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (função eferente). A susceptibilidade à capsaicina distingue estes neurônios de outros neurônios aferentes primários (Holzer, 1991; Szallasi e Blumberg, 1996).

Recentemente, o receptor para a capsaicina foi clonado tratando-se de um canal catiônico não-seletivo estruturalmente relacionado aos canais iônicos da família TRP (*Tyrosinase-related protein*). A clonagem do receptor (VR1) demonstra que o alvo molecular da ação da capsaicina nos neurônios sensoriais é um canal iônico protéico. O receptor VR1 parece mediar influxos de cálcio extracelular em resposta à depleção de estoques de cálcio intracelular. O receptor da capsaicina clonado é ativado não somente por compostos vanilóides, mas também por estímulos térmicos, o que não exclui a possibilidade de pequenas moléculas ou outros fatores endôgenos também modularem a função do receptor vanilóide. Existem comprovações de que

prótons podem potencializar as respostas evocadas por vanilóides em oócitos que expressam VR1 (Caterina *et al.*, 1997).

No teste da capsaicina, dependendo da via de administração, o poligodial foi cerca de 4 a 53 vezes mais potente que a dipirona (Beirith *et al.*, 1998), mas em torno de duas vezes menos potente que a morfina. Considerando o presente estudo com o poligodial, tanto no modelo da formalina quanto no modelo da capsaicina, é possível considerar esse composto com potencialidade terapêutica para o tratamento da dor de origem neurogênica, cuja complexidade não tem permitido alternativas terapêuticas satisfatórias (Wall, 1995).

Inúmeros estudos disponíveis na literatura indicam a participação de vários sistemas no mecanismo de regulação da informação nociceptiva no sistema nervoso central. Assim, foi verificada a participação do sistema opióide na antinocicepção causada pelo poligodial. O tratamento prévio dos animais com naloxona, um antagonista não-seletivo do receptor opióide, reverteu quase que completamente não apenas a antinocicepção produzida pela morfina, mas também a antinocicepção causada pelo poligodial, quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Tais resultados mostram, portanto, que suas ações antinociceptivas provavelmente envolvem interação com o sistema opióide sensível à naloxona.

Ao lado da evidência que sugere o envolvimento de peptídeos opióides na antinocicepção produzida pelo poligodial, o sesquiterpeno foi completamente destituído de efeito antinociceptivo, quando testado num modelo térmico agudo

de dor - o teste da placa quente -; nem apresentou qualquer evidência de tolerância cruzada com a morfina, quando administrado em animais que receberam uma injeção subcutânea desse opióide durante sete dias consecutivos. Quando testado no modelo de dor da placa quente (Woolfe e MacDonald, 1944; Eddy e Leimback, 1953), o poligodial não apresentou efeito antinociceptivo mesmo quando usado em doses três vezes maiores que as necessárias para produzir analgesia em modelos de dor de origem neurogênica e/ou inflamatória e em condições experimentais em que a morfina apresentou potente efeito analgésico. O modelo de nocicepção da placa quente é geralmente utilizado para o estudo de drogas analgésicas do tipo da morfina (Carter, 1991; O'Callaghan e Holtzman, 1975; Woolfe e MacDonald, 1994; Zimer *et al.*, 1986). Não se tem, no momento, explicação para tal discrepância; por isso, novos estudos comportamentais e bioquímicos deverão ser dirigidos para o entendimento dessa questão.

A ativação da via noradrenérgica através da ativação de adrenoreceptores α_2 , localizados pré-sinápticamente em terminais noradrenérgicos, originando-se no tronco encefálico e mesencéfalo, produz não somente inibição nociceptiva, mas sinergismo de efeito com agonistas opióides em receptores μ . A possibilidade do uso de agonistas de receptores α_2 como analgésicos depende de avaliações relativas ao aparecimento de efeitos adversos, tais como sedação, hipotensão e efeitos motores (Dray *et al.*, 1994). O papel dos receptores α_1 adrenérgicos na antinocicepção foi investigado por Tasker *et al.* (1992) no teste da formalina. A fenilefrina e a clonidina (agonistas

seletivos dos receptores α_1 e α_2 , respectivamente), injetados sistemicamente, produzem antinocicepção, ação essa revertida por antagonistas seletivos dos mesmos receptores (Butelman e Woods, 1993; Kawabata *et al.*, 1994; Kayser *et al.*, 1992; Laneuville *et al.*, 1989; Tasker *et al.*, 1992; Uhlén *et al.*, 1990). Em nossos experimentos, observamos que o prazosin (antagonista seletivo α_1 adrenérgico), mas não a ioimbina (antagonista seletivo α_2 adrenérgico), foi capaz de reverter a ação antinociceptiva do poligodial em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, sugerindo estarem os receptores α_1 (mas não α_2) adrenérgicos de alguma forma envolvidos no efeito antinociceptivo causado pelo poligodial.

A via da L-arginina-óxido nítrico desempenha um papel modulador nos processos nociceptivos sensíveis à morfina, avaliado em vários modelos experimentais incluindo as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, placa quente e *tail-flick* (Brignola *et al.*, 1994). A administração sistêmica ou central de L-NOARG (inibidor da óxido nítrico sintase) causa significativo efeito analgésico em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, bem como inibição da hiperalgesia induzida por agonistas de receptores de NMDA (Kitto *et al.*, 1992). Além disso, o inibidor do NO deprime a facilitação do reflexo nociceptivo (Verge *et al.*, 1992) e reduz a resposta em neurônios dorsais da medula após estimulação mecânica e térmica (Coderre e Yashpal, 1994; Moore *et al.*, 1991; Yaksh e Rudy, 1977; Yamamoto *et al.*, 1993). Os nossos experimentos demonstraram que a L-arginina (precursor do óxido nítrico) (Moncada *et al.*, 1991) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do

poligodial. Por outro lado, a administração sistêmica de L-arginina reverteu quase que completamente o efeito antinociceptivo da L-NOARG (inibidor da enzima óxido nítrico sintase) em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. A manutenção do efeito antinociceptivo do poligodial, mesmo após o tratamento sistêmico dos animais com L-arginina, demonstra que não parece haver a participação da via L-arginina - óxido nítrico na ação antinociceptiva do composto.

O GABA participa de uma variedade de eventos farmacológicos, incluindo a analgesia (Sawynok, 1984; Sivam e Ho, 1983). A injeção sistêmica do agonista GABA_B baclofen produz analgesia nos testes do *tail-flick*, na placa quente, no teste das contorções abdominais e na dor induzida na artrite (Bartolini *et al.*, 1981; Cutting e Jordan, 1975; Hill e Bowery., 1981; Levy e Proudfit, 1977; Sawynok e Labella, 1982).

Nossos resultados demonstraram também que o efeito antinociceptivo do poligodial provavelmente não envolve a interação com os receptores GABA_A ou GABA_B. O baclofen e o muscimol (agonistas seletivos dos receptores GABA_A e GABA_B, respectivamente) promovem ação antinociceptiva quando administrados em camundongos durante o teste da dor induzida pela formalina, ação essa que é revertida pelo baclofen ou pela bicuculina. Esse efeito analgésico, segundo Lloyd e Morselli (1987) e Malcangio *et al.*, (1991), parece envolver, pelo menos em parte, a redução da transmissão nervosa pelas fibras C ou pela ação nas próprias fibras nervosas junto ao corno dorsal na medula espinhal, bem como pela abertura de canais neuronais de potássio (Ocaña e

Bae-Yens, 1993). Em nossos experimentos, os antagonistas seletivos de receptores GABAérgicos bicuculina (GABA_A), bem como o faclofen (GABA_B), quando administrados sistemicamente, não foram capazes de modificar significativamente a antinocicepção causada pelo poligodial, em doses suficientes para reverter o efeito analgésico causado pelos agonistas seletivos muscimol (GABA_A) e baclofen (GABA_B).

O sistema serotoninérgico pode estar envolvido na modulação da nocicepção (Barber *et al.*, 1989; Fisher e Bodnar, 1992; Sandrini *et al.*, 1995). Vários estudos sugerem que o PCPA, inibidor da biossíntese de 5-HT, é capaz de antagonizar a antinocicepção causada por substâncias analgésicas, incluindo a morfina e alguns antiinflamatórios não-esteroidais (Taber e Latranyi, 1981; VonVoigtlander *et al.*, 1984; Pini *et al.*, 1996). A 5-HT produz leve e transitória nocicepção por ativação direta de neurônios sensoriais via receptores 5-HT₃, induzindo também uma sensibilização direta dos nociceptores via receptores 5-HT₁ e receptores 5-HT₂. Tem sido postulado que uma possível base para essa sensibilização induzida por 5-HT, como também pela BK e prostanóides, é a redução do potencial inibitório que segue o potencial de ação em alguns neurônios sensoriais. A inibição é mediada pelo AMPc e pela redução de correntes inibitórias de K⁺ (Dray *et al.*, 1994; Björkman, 1995). O pré-tratamento dos animais durante quatro dias consecutivos com PCPA reverteu o efeito analgésico da morfina (Taber e Latranyi, 1981 e presente estudo) e foi capaz de interferir parcialmente na ação antinociceptiva do poligodial, indicando que a ação antinociceptiva desse sesquiterpeno parece

envolver pelo menos em parte, a interação com os neurônios serotoninérgicos centrais, sabidamente envolvidos na modulação da transmissão da dor.

O mecanismo pelo qual o poligodial produz antinocicepção não foi até o momento completamente compreendido. Entretanto, nossos resultados mostram que o efeito antinociceptivo do poligodial foi significativamente inibido nos animais tratados com a toxina pertussis (1 μ g/sítio, administrada sete dias antes do experimento), protocolo esse que demonstrou em estudos anteriores e confirmou no presente estudo, suprimir o efeito analgésico causado pela morfina através da ribosilação do ATP (Sánchez-Blásquez e Gárzon, 1991; Hernandez *et al.*, 1995; Beirith *et al.*, 1998). Portanto, tais resultados indicam que a antinocicepção causada pelo poligodial, tal como a da morfina, parece envolver o acoplamento à proteína G_i/G_o, cujos mecanismos são sensíveis à toxina pertussis.

Flower *et al.* (1986) induziram pleurisia em animais adrenalectomizados e falso-operados, tendo observado que a intensidade e a duração da inflamação, avaliadas pela exsudação e migração celular, foram aumentadas aproximadamente em duas vezes em ratos adrenalectomizados quando comparados aos animais-controle. Tais estudos sugerem que os glicocorticóides endógenos exercem uma ação inibitória tônica sobre a atividade da fosfolipase em animais normais e que o aumento da secreção desses hormônios durante a resposta inflamatória modula o desenvolvimento do processo inflamatório. Nossos experimentos, realizados em animais que foram submetidos à adrenalectomia bilateral uma semana antes do teste (teste da

formalina), demonstraram que a antinocicepção causada pelo poligodial não foi afetada pela adrenalectomia prévia dos animais, sugerindo que os hormônios glicocorticóides endógenos não participam na atividade antinociceptiva apresentada pelo composto.

No teste do *rota-rod* avaliamos a atividade motora dos camundongos e, conseqüentemente, se as ações antinociceptivas causadas pelo poligodial poderiam estar relacionadas a efeitos inespecíficos da substância no sistema nervoso central ou periférico. Descartamos tal possibilidade visto que o poligodial, na dose que produziu antinocicepção em vários modelos de dor, não afetou significativamente a performance desses animais.

Além das ações antinociceptivas do poligodial, nossos resultados mostram que esse sesquiterpeno apresenta propriedades antiedematogênicas marcantes. No presente estudo, o edema de pata em camundongos foi utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico do poligodial. A inibição dos edemas resultantes da injeção i.pl. de BK, carragenina, dextrana, PLA₂, PGE₂ e SP oferece um importante suporte para a discussão a respeito das propriedades antiinflamatórias do poligodial e de seu espectro de ação.

O poligodial, quando testado no edema de pata induzido pela bradicinina, apresentou significativo efeito inibitório sobre o mesmo. As cininas são peptídeos vasoativos que desempenham importantes funções como mediadores inflamatórios, os quais são normalmente liberados em decorrência de trauma tecidual ou infecção. Os resultados obtidos com o poligodial confirmam e estendem estudos anteriores, sendo, além disso, compatíveis com os

experimentos realizados em órgãos isolados e experimentos *in vivo* nos quais extrato de *D. winteri* e o composto foram capazes de inibir as ações da bradicinina.

O poligodial inibiu, também de maneira dose-dependente, os edemas de pata induzidos pela carragenina e pela dextrana, em doses menores que aquelas necessárias para inibir o edema induzido por BK. Está bem documentado que vários mediadores inflamatórios, entre os quais as cininas, PGs, histamina e PAF-acéter, estão envolvidos nas respostas edematogênicas provocadas pela carragenina e dextrana (Vinegar *et al.*, 1987; De Brito, 1989; Landucci *et al.*, 1995). A injeção i.pl de carragenina produz edema de pata em camundongos o qual apresenta duas fases distintas: a primeira entre 0 e 24 h, e a segunda 24 h após a injeção de carragenina. Durante a primeira fase, os neutrófilos foram as células predominantes, enquanto que, durante a segunda, houve acúmulo de células mononucleares e eosinófilos. Todas essas células são potencialmente capazes de liberar mediadores inflamatórios, tais como aminas vasoativas, PGs, fatores quimiotáticos, LTs, PAF e componentes lisossomais, além de radicais derivados do oxigênio (Henriques *et al.*, 1987). A dextrana pertence a uma variedade de compostos que são capazes de ativar o sistema multifuncional de proteases, controlar a vasoregulação e amplificar a resposta humoral inflamatória. É uma macromolécula carregada negativamente, capaz de ativar a pré-caliceína (Kluft, 1978), que é rapidamente convertida em caliceína, num processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sanguínea (Fator Hagemann). A ação da caliceína plasmática sobre o

cininogênio resulta na formação da BK (Bathon e Proud, 1991; Bhoola *et al.*, 1992). A dextrana libera BK no plasma de cobaias e causa extravasamento plasmático traqueal via ativação de receptores B₂. A injeção venosa de dextrana em animais tratados com azul de Evans promove a formação de edema, que é predominantemente mediado por 5-HT, acompanhada provavelmente por metabólitos do AA na via da lipooxigenase (Van Wauve e Goossens, 1986). Resultados anteriores (Tratsk, *et al.*, 1998) demonstraram que o EH de *D. winteri*, administrado oralmente em ratos, foi capaz de inibir a resposta edematogênica induzida pela carragenina, pela dextrana, pela BK, pela SP e pelo PAF. Analisados em conjunto, nossos resultados mostraram que a inibição da formação do edema pelo poligodial é dependente da mobilização de neutrófilos, visto estarem essas células predominantes nas respostas edematogênicas descritas e serem hábeis para liberar vários agentes inflamatórios.

O poligodial inibiu também o edema de pata em camundongos induzido por PLA₂. As enzimas PLA₂ têm importante papel na produção de potentes mediadores inflamatórios, tais como as PGs, LTs e PAF (Dennis, 1983). A PLA₂ secretória, uma PLA₂ extracelular, é a mais estudada e está envolvida na patogênese em estágios inflamatórios no campo experimental e clínico (Pruzanski e Vadas, 1991; Vadas e Pruzanski, 1993). Altos níveis de PLA₂ secretória podem ser encontrados no exsudato pleural induzido por carragenina em ratos (Tanaka *et al.*, 1993). Além disso, existem evidências sugerindo que a ação pró-inflamatória da PLA₂ envolve, entre outras, a degranulação de

mastócitos e a conseqüente liberação de histamina e 5-HT (Cirino *et al.*, 1989; Tocker *et al.*, 1990). Considerando os resultados obtidos com o poligodial no edema de pata induzido por PLA₂, é possível postular que a atividade antiedematogênica do poligodial esteja relacionada, pelo menos em parte, com a inibição da liberação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios ou, ainda, à sua atividade antagonista da 5-HT. É importante lembrar que o poligodial inibiu também o edema de pata induzido por dextrana, que tem importante participação de 5-HT e de histamina (Van Wauwe e Goossens, 1986).

Os efeitos produzidos pelas injeções intradérmica, intravenosa ou intra-arterial de pequenas quantidades de PGs correspondem àqueles observados na inflamação. O poligodial administrado por via i.p. inibiu de maneira dose-dependente o edema de pata em camundongos induzido por PGE₂. Esses resultados estão de acordo com experimentos prévios que demonstraram ser o EH da *D. winteri* capaz de inibir o edema de pata induzido por PGE₂ em ratos, bem como deslocar para a direita e de maneira concentração-dependente a curva concentração-resposta à PGE₂ na traquéia isolada de cobaia (El Sayah, 1996). A PGE₂ causa eritema e aumento no fluxo sanguíneo local persistentemente e antagoniza os efeitos vasoconstritores de substâncias, tais como NE e angiotensina. Contrariamente a seus efeitos nos vasos cutâneos e veias superficiais, a vasodilatação induzida pela prostaglandina em outros leitos vasculares desaparece em poucos minutos. Embora a PGE₂ cause edema quando injetada por via i.p., não está claro se ela pode aumentar a

permeabilidade vascular (extravasamento) sem a participação de outros mediadores inflamatórios (BK, histamina, LTC₄) (Insel, 1996).

A substância P injetada por via i.pl. causa edema de pata atingindo pico em 15 min. O poligodial administrado por via i.p. causou inibição do edema induzido pela SP, sugerindo que suas ações resultam de um mecanismo adicional de interação com receptores taquicinérgicos ou com suas ações. Na parte introdutória deste trabalho, foi descrito que o extrato de *D. winteri* e também o próprio poligodial antagonizaram, de maneira aparentemente seletiva, a contração provocada por agonistas NK₂ (mas não NK₁) na traquéia isolada de cobaia (El Sayah *et al*, 1997, 1998). Além disso, foi também relatado que o EH reverteu de maneira dose-dependente a hiperalgesia induzida por SP e pela BK no modelo do edema de pata em ratos (Mendes, *et al.*, 1998). Os dados do presente estudo mostraram também que o poligodial, administrado sistemicamente, foi capaz de inibir o edema de orelha em camundongos, induzido por três diferentes agentes, ou seja, o AA, a capsaicina e o óleo de cróton, sugerindo, assim, um perfil antiinflamatório de amplo espectro.

O presente estudo mostrou que a aplicação tópica do AA na orelha de camundongos produziu uma resposta edematogênica aguda que atingiu seu efeito máximo em uma hora, tendo sido inibida pela administração de poligodial por via i.p.. O AA produz uma reação inflamatória transitória aguda com imediato eritema, edema e elevada concentração tecidual de PGs e LTs (Opas *et al.*, 1985). Embora não seletivo, esse teste tem sido usado para estudar *in vivo* inibidores da 5-lipooxigenase; o uso de camundongos faltando a 5-lipo-

oxigenase tem confirmado a dependência desse modelo na produção de LTs (Chen, *et al.*, 1994). Com base nesses resultados, podemos especular que a ação antiedematogênica do poligodial em relação ao edema de orelha induzido por AA pode resultar da sua ação em inibir os produtos da via da lipooxigenase.

Os nossos experimentos demonstraram também que o poligodial inibiu o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, que é dependente principalmente da geração de produtos do metabolismo do AA, sendo o mesmo muito sensível à ação dos glicocorticóides e, em menor grau, às drogas inibidoras da ciclooxigenase (Tubaro *et al.*, 1986; Carison *et al.*, 1985; Young *et al.*, 1989; Zanini *et al.*, 1992). Vários estudos demonstraram ainda que o princípio ativo do óleo de cróton (o diterpeno 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato), um conhecido promotor tumoral, induz resposta inflamatória na orelha de camundongos pela ativação da proteína cinase C (Kuchera *et al.*, 1993). A ativação da proteína cinase C está associada com várias vias de transdução de sinais intracelulares implicadas na patogênese da inflamação, incluindo a liberação de AA dependente da PLA₂, a produção de eicosanóides, a formação de metabólitos reativos de oxigênio, a síntese de citocinas inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão necessárias para o recrutamento de leucócitos nos vasos (Bakouche *et al.*, 1992; Mattila *et al.*, 1992). O poligodial utilizado no edema de orelha induzido por óleo de cróton demonstrou atividade inibitória que pode resultar da inibição da PLA₂ e da atividade da ciclooxigenase.

Estudos mostram que a capsaicina aplicada topicamente na orelha de camundongos produz inflamação neurogênica (Mantione e Rodriguez, 1990; Inoue *et al.*, 1993). Nossos resultados demonstraram também que o poligodial inibiu de maneira dose-dependente o edema de orelha induzido pela capsaicina. Estudos anteriores têm demonstrado que o edema de orelha em camundongos induzido pela capsaicina é inibido por antagonistas de receptores NK₁, antagonistas de histamina e/ou 5-HT, mas não por inibidores de metabólitos do AA (Inoue *et al.*, 1993). Isso implica dizer que o edema de orelha induzido pela capsaicina é primariamente mediado pela histamina (e 5-HT), liberada dos mastócitos, e pelos neuropeptídeos, liberados através da ativação de nervos sensoriais na pele do camundongo.

Outro teste utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória do poligodial foi o modelo da pleurisia. Com o desenvolvimento desse modelo, foi possível fazer a avaliação não só do extravasamento de líquido como também da migração de células induzidas por diversos agentes flogísticos (De Brito, 1989). A técnica da pleurisia possui vantagens em relação à do edema de pata, pois, a partir da coleta do lavado da cavidade pleural, é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação. Uma outra vantagem adicional da pleurisia é a sua fácil execução, além de responder a diferentes agentes flogísticos (específicos e não-específicos). O poligodial testado nesse modelo inibiu significativamente a migração celular induzida pela carragenina 4 h após. No entanto, a exsudação resultante da primeira fase dessa resposta inflamatória não foi alterada.

Finalmente, nossos estudos avaliaram a atividade antialérgica do poligodial através da indução de choque anafilático em camundongos sensibilizados por OVO e indução de edema de pata pela injeção de OVO em ratos sensibilizados pelo antígeno. Tais estudos demonstraram que o poligodial tem propriedades antialérgicas pronunciadas quando testado em animais sensibilizados ao antígeno. Esses resultados confirmaram e estenderam dados obtidos com o extrato da *D.winteri* e com o próprio poligodial, os quais, quando testados na traquéia de cobaias sensibilizados à OVO, causaram inibição significativa da resposta contrátil induzida pelo antígeno (El Sayah, *et al.*, 1997; 1998). Além disso, o EH havia inibido o edema de pata em ratos ativamente sensibilizados com OVO e aumentado a taxa de sobrevivência ao choque anafilático induzido por OVO em camundongos sensibilizados (Tratsk, *et al.*, 1997).

Concluindo, os resultados do presente estudo, em conjunto com outros descritos recentemente (El Sayah 1996; El Sayah *et al.*, 1997; 1998; Tratsk *et al.*, 1998; Mendes *et al.*, 1998), indicam que o poligodial apresenta efeito antinociceptivo significativo, quando testado em vários modelos de nocicepção, como no teste de contorções abdominais induzidas por vários irritantes e nos modelos da formalina e da capsaicina em camundongos. O poligodial apresentou significativa ação antinociceptiva quando administrado por via i.p, oral, i.t., i.c.v. e i.pl. nos modelos da formalina e da capsaicina, o que sugere que possui ações local, sistêmica, espinhal ou supra-espinhal. Por outro lado,

quando testado no modelo de dor da placa quente e da hiperalgesia induzida pelo glutamato, o poligodlal não apresentou efeito antinociceptivo.

As ações antinociceptivas do poligodlal parecem envolver interação com mecanismos dependentes da proteína G_i/G_o sensíveis ao tratamento com a toxina pertussis, bem como o sistema opióide através de um mecanismo sensível à naioxona. Além disso, parecem envolver, pelo menos em parte, o sistema serotoninérgico e os receptores adrenérgicos α_1 . Um mecanismo adicional que poderia também contribuir para explicar a ação antinociceptiva do poligodlal, particularmente em relação à dor neurogênica, é sua possível interação com os receptores e/ou ação das taquicininas. Ao contrário, a via do NO, os receptores $GABA_A$ e $GABA_B$, e a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP não parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva do poligodlal. Além disso, a ação antinociceptiva do poligodlal não é modulada pelos hormônios glicocorticóides e não parece depender de possíveis efeitos depressores inespecíficos exercidos por esse composto central ou periféricamente.

Nossos resultados indicaram ainda um pronunciado efeito antiinflamatório para o poligodlal, quando testado em modelos de inflamação como edema de pata, edema de orelha e na pleurisia induzida por carragenina. Administrado por via i.p., o poligodlal apresentou significativo efeito inibitório nos edemas de pata induzidos por BK, carragenina, dextrana, PLA_2 , PGE_2 e SP e nos edemas de orelha induzidos por AA, capsaicina e óleo de cróton. Além

disso, o poligodial inibiu a migração celular para a cavidade pleural na pleurisia induzida pela carragenina, indicando um amplo perfil antiinflamatório.

Os resultados observados com o poligodial permitem, portanto, sugerir que a sua ação antiedematogênica e antiinflamatória pode estar relacionada com a inibição da geração de ambos os produtos da lipooxigenase e da ciclooxigenase, na cascata da via do ácido AA. É possível que outros mecanismos estejam também envolvidos nas atividades antiinflamatórias e antialérgicas do poligodial, resultantes da interação do composto com receptores e/ou segundos mensageiros relacionados a outros mediadores pró-inflamatórios (El Sayah, *et al.*, 1997), além de outros parâmetros, incluindo a geração de metabólitos reativos de oxigênio, a inibição da ativação de células do tipo mastócitos mediadas por neuropeptídeos e a interação com citocinas.

Também relevantes no presente estudo foram os resultados que demonstraram a ação antialérgica do poligodial tanto em ratos como em camundongos sensibilizados à OVO. A taxa de sobrevivência de animais submetidos a choque anafilático induzido por OVO foi significativamente aumentada, assim como o edema de pata alérgico induzido pelo antígeno foi significativamente inibido.

Isso posto, acreditamos que o poligodial pode ser de interesse para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas destinadas ao manejo da dor e da inflamação neurogênica. Com base neste estudo, sugere-se que o poligodial poderia ser útil também para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de processos inflamatórios neurogênicos, na asma e na alergia. Estudos adicionais

utilizando técnicas bioquímicas e estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas, antiinflamatórias e antialérgicas do poligodial. Além disso, modificações estruturais no composto poderão melhorar sua eficácia e/ou reduzir possíveis efeitos tóxicos que a droga venha a revelar.

Parte dos resultados apresentados foi aceita ou encaminhada para publicação, quais sejam:

1. MENDES, G. L.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, M. M.; TRATSK, K. S.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; CALIXTO, J. B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial from de Barks of *Drymis winteri*. *Life Sci.*, 1998 (In press).
2. CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A. R. S.; PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; MENDES, G. L.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D. Isolation and identification of active compounds from *Drymis winteri*. *J. Ethnopharmacol.*, 1998 (In press).
3. MENDES, G. L.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; PINHEIRO, T.R.; CALIXTO, J. B. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal injection of polygodial, a sesquiterpene isolated from the Bark of *Drymis winteri*. *Pharmacol Ther.*, 1998 (Submetido a publicação).

Referências bibliográficas

- AANONSEN, L. M.; WILCOX, G. L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine e sigma agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 243: 9-19, 1987.
- ACEVEDO, C. G.; LEWIN, J.; CONTRERAS, E.; HUIDOBRO-TORO, J. P. Bradykinin facilitates the purinergic motor component of the rat bladder neurotransmission. **Neurosci. Lett.**, 113: 227-232, 1990.
- AKIL, H.; WATSON, S. J.; YOUNG, E.; LEWIS, M. E.; KHACHATURIAN, H.; WALKER, J. M. Endogenous opioids: biology and function. **Ann. Rev. Neurosci.**, 7: 223-255, 1984.
- ALMEIDA, F. R. C. Efeito da canulação intratecal crônica sobre a resposta nociceptiva em ratos. Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, p. 1-96, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Tese de doutorado, 1996.
- AMORIM, C. Z.; CORDEIRO, R. S. B.; VARGAFTIG, B. B. Involvement of platelet-activating factor in death following anaphylatic shock in boosted and in unboosted mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 235: 17-22, 1993.
- BAINTON, D. F. Development biology of neutrophils and eosinophils. In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Eds. Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Snyderman, R., p. 303-324, New York: Raven Press Ltda, 1992.
- BARTOLD, P.M.; KYLSTRA, A.; LAWSON, R. Substance P: An immunohistochemical and biochemical study in human gingival tissues. A role for neurogenic inflammation. **J. Periodontol.**, 12: 1113-1121, 1994.
- BARTOLINI, A.; BARTOLINI, R.; BISCINI, A.; GIOTTI, A. MALMBERG P. Investigations into baclofen analgesia: effect of naioxone, bicuculine, atropine and ergotamine. **Br. J. Pharmacol.**, 72: 156-157, 1981.
- BATHON, J. M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 31: 129-162, 1991.
- BATTISTINI, B.; BOTTING, R.; BAKHLE, Y. S. COX-1 and COX-2: toward the development of more selective NSAIDS. **Drug New Perspect.**, 7: 501-512, 1994.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A.L. S.; CRECZYNSKI-PAZA, T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dypirone

- on formalin and capsaicin tests. Study of the mechanisms of action. **Eur. J. Pharmacol.**, 1998 (In press).
- BENTLEY, G. A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkefalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Br. J. Pharmacol.**, 73: 325-333., 1981.
- BETZ, H. Structure and function of inhibitory glycine receptors. **Q. Rev. Biophys.**, 25: 381-394, 1992.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of same biological coin. **Nature**, 320: 584-588, 1986.
- BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leucocyte adhesion molecules. **Ann. Rev. Immunol.**, 11: 767-804, 1993.
- BHARGAVA, H. N.; SHARMA, S. S.; BIAN, J. T. Evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors in L-arginine-induced attenuation of morphine antinociception. **Brain Res.**, 782: 314-317, 1998.
- BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.
- BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, 39: 1-44, 1995.
- BLANE, G. F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, 19: 367-373, 1967.
- BLUMBERG, H.; WOLF, P.S.; DAYTON, H.B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 118: 763-766, 1965.
- BOROWSKY, B.; MEZEI, E.; HOFFMAN, B.J. Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene. **Neuron**, 10: 851-863, 1993.
- BOUTHILLIER, J.; DEBLOIS, D.; MARCEAU, F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg⁹-bradykinin in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, 92: 257-264, 1987.
- BOWERI, N. G.; GABA_B receptor pharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 33: 109-117, 1993.

- BRAIN, S. D.; WILLIAMS, T. J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin-gene related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, 86: 855-860, 1985.
- BRIGNOLA, G.; CALIGNANO, A.; DI ROSA, M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 1372-1376, 1994.
- BROWN, G. D. Drimendiol, a sesquiterpene from *Drymis winteri*. **Phytochemistry**, 35: 975-977, 1994.
- BUELL, G.; SCHULTZ, M. F.; ARKINSTALL, S. J.; MAURY, K.; MISSOTEN, M.; ADAMI, N.; TALABOT, F.; KAWASHIMA, E. Molecular characterization expression and localization of human NK₃ receptor. **FEBS Lett.**, 299: 90-95, 1992.
- BUTELMAN, E. R.; WOODS, J. H. Effects of clonidine, dexmedetomidine and xylazine on thermal antinociception in rhesus monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 264 (2): 762-769, 1993.
- CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Characterization of bradykinin mediating pertussis-toxin-insensitive biphasic responses in circular muscle of the isolated guinea pig ileum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 259: 659-665, 1991.
- CAO, Y. Q.; MANTYH, P. W.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; EPSTEIN, C. J. H.; BASBAUM, A. I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, 392: 390-394, 1998.
- CARLSON, R. P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A. L. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipooxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents Actions**, 17: 197-204, 1985.
- CARRETERO, O. A.; SCICLI, A. G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine and paracrine) in hypertension. **Hypertension**, 18: 158-169, 1991.
- CARTER, R. B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, 47: 211-220, 1991.
- CATERINA, M.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824, 1997.
- CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A. R. S.; PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; MENDES, G. L.; CALIXTO, J. B.; MONACHE, F. D. Isolation

- and identification of active compounds from *Drymis winteri*. **J. Ethnopharmacol.**, 1998 (In press).
- CHEN, X-S.; SHELLER, J. R.; JOHNSON, E. N.; FUNK C. D. Role of leukotriene revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. **Nature**, 372: 179-182, 1994.
- CHIEN, C. C.; PASTERNAK, G. W. Selective antagonism of opioid analgesia by a *sigma* system. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 271 (3): 1583-1590, 1994.
- CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; REGOLI, D. Effect of bradykinin antagonists, NG-monomethyl-L-arginine and L-NG-nitro arginine on phospholipase A₂ induced oedema in rat paw. **Gen. Pharmacol.**, 22: 801-804, 1991.
- CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. K. A study of phospholipase A₂ induced oedema in rat paw. **Eur. J. Pharmacol.**, 166: 505-510, 1989.
- CODERRE, T. J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosc.**, 12: 3665-3670, 1992.
- CODERRE, T. J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Pharmacol.**, 6: 1328-1334, 1994.
- COLLIER, H. O.; LEE, I. R. Algesic actions of bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, 21: 151-158, 1963.
- COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A. ; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, 32: 295-310, 1968.
- CONN, J.P.e PIN, J. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 205-307, 1997.
- CONNEL, B. J.; BARNES, J.C.; BLATT, T.; TASKER, R. A. R. Rapid development of tolerance to morphine in the formalin test. **Neuroreport**, 5: 817-820, 1994.
- CORK, M. J.; DUFF, G. W. Interleukin one. In: **Epidermal growth factors and cytokines**. Eds. Luger, T. A.; Schwartz, T., p. 19-48, New York: Marcel Dekker, 1993 .

- CORRÊA, C. R.; KYLE, D. J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B₂ bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 117: 552-558, 1996.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ e B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 193-198, 1993.
- COTRAN, R. I.; KUMAR, Z.; ROBBINS, S.L. Inflamação e Reparo. In: **Robbins Patologia Estrutural e funcional**. Eds. Cotran, R. I.; Kumar, Z.; Robbins, S. L., p. 33-72, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1991.
- CZOP, J. K. Phagocytosis of particulate activators of the alternative complement pathway: effect of fibronectin. **Adv. Immunol.**, 38: 361-398, 1986.
- COWAN, A.; PORRECA, F.; WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluation analgesics. **NIDA Res. Monog.**, 95: 116-122, 1989.
- CRAMER, E. B. Cell Biology of phagocyte migration from the bone marrow, out the bloodstream, and across organ epithelia. In: **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Eds. Gailin, J. I.; Goldstein, I. M.; Snyderman, R., p. 341-349, New York: Raven Press, Ltda, 1992.
- CUTTING, D. A.; JORDAN, C. C. Alternative approaches to analgesia: the baclofen as model compound. **Br. J. Pharmacol.**, 54: 171-179, 1975.
- DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G.; NGUYEN, P. Inhibition by WEB 2086, a PAF-Acether antagonist of oedema and peritonitis induced by zymosan in rats. **Arch. Intern Pharmacodin. Thér.**, 306: 161-169, 1990.
- DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. **Br. J. Surg.**, 84: 920-935, 1997.
- DE BRITO, F. D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: **Pharmacological Methods in the Control of Inflammation**. Ed. Liss, A. A. R., p. 173-228, Dagenham: Rhone Poulenc LTD, 1989.
- DE CAMPOS, R. O. P.; ALVES, R. V.; KYLE, D. J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B. J.; CALIXTO, J. B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 316: 277-286, 1996.
- DEFELIPE, C.; HERRERO, J. F.; OBRIEN, J. A.; PALMER, J. A.; DOYLE, C. A.; SMITH A. J. H.; LAIRD, J. M. A.; BELMONTE, C.; CERVERO, F.; HUNT, S.

- P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for a substance P. **Nature**, 392: 394-397, 1998.
- DENNIS, T.; FOURNIER, A.; CADIEUX, A.; POMERLEAU, F.; JOL COEUR, F. B.; ST PIERRE, S.; QUIRION, R. Hcgrp-37, a calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 251: 718-725, 1990.
- DENNIS, E. A. Phospholipases. in: **The enzymes**, ed. Boyer, P. D. p. 307, New York: Academic Press, 1983.
- DE YOUNG, L. M.; DE KHEIFETS, J. B.; BALLARON, J. B.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, 26: 335-341, 1989.
- DICKENSON, A. H. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, 27: 223-227, 1995.
- DIMITRIADOU, V.; BUZZI, M. G.; THEOHARIDES, T. C.; MOSKOWITZ, M. A. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. **Neuroscience**, 48: 187-203, 1992.
- DINARELO, C. A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. **Adv. Immunol.**, 44: 153-205, 1989.
- DONALDSON, L. F.; HANLEY, M. R.; VILLABRANCA, A. C. Inducible receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 171-181, 1997.
- DOYLE, A. G.; HERBEIN, G.; MONTANER, L. J. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages *in vitro*: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. **Eur. J. Immunol.**, 24: 1441-1445, 1994.
- DRAY, A. Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. **Bioch. Pharmacol.**, 44: 611-615, 1992.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, 16: 99-104, 1993.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trend Pharmacol. Sci.**, 15: 190-197, 1994.

- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4: 161-174, 1977.
- DUGGAN, A. W.; FOONG, F.W. Bicuculine and spinal inhibition produced by dorsal column stimulation in the cat. **Pain**, 22, 249-259, 1985.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Amer. Pharm. Assoc.**, 46: 208-209, 1957.
- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenil and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 107: 385-393, 1953.
- EL SAYAH, M. E. Análise farmacológica do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* e de alguns de seus constituintes em diversos músculos lisos "in vitro". Departamento de Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. p. 1-145. Florianópolis. Brasil. Tese de mestrado, 1996.
- EL SAYAH, M. E.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. ; CALIXTO, J. B. Action of the extract of *Drymis winteri* on contraction induced by inflammatory mediators, compound 48/80 and ovalbumin of the guinea-pig trachea *in vitro*. **Gen. Pharmacol.**, 28: 699-704, 1997.
- EL SAYAH, M.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; PINHEIRO, T. A.; CALIXTO, J. B. Action of polygodial, a sesquiterpe isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea "in vitro". **Eur. J. Pharmacol.**, 1998. In press.
- FERGUSON, A. C.; VAUGHAN, R.; BROWN, H.; CURTIS, C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 95: 23-28, 1995.
- FLEMING, W. W.; WESTPHALL, D. P.; DE LA LANDE, I. S.; JELLET, L. B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 181: 339-345, 1972.
- FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J. A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. **Br. J. Pharmacol.**, 87: 57-62, 1986.
- FÖRSTERMANN, U.; POLLOCK, J. S.; SCHMIDT, H. H. H.; HELLER, M.; MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of

- bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 88: 1788-1792, 1991.
- FRENETTI, P. S.; WAGNER, D. D. Adhesion molecules - part II: blood vessels and blood cells. **New Eng. J. Med.**, 335: 143-145, 1996.
- FRENETTI, P. S.; WAGNER, D. D. Molecular medicine adhesion molecules - part I. **New Eng. J. Med.**, 334: 1526-1529, 1996.
- FUJIYOSHI, T.; HAYASHI, I.; OH-ISHI, S.; KUWASHIMA, M.; DOZEN, M.; TANAGUCHI, N.; IKEDA, K.; OHNISHI, H. Kaolin-induced writhing in mice, a new model of possible bradykinin-induced pain for assessment of analgesic agents. **Agents Actions**, 27: 332-334, 1989.
- FUNDYTUS, M.E.; FISHER, K.; DRAY, A.; HENRY, J. L.; CODERRE, T. J. In vivo antinociceptive activity of anti-rat mGluR (1) and mGluR (5) antibodies in rats. **Neuroreport**, 9: 731-735, 1998.
- GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **New Engl. J. Med.**, 328: 257-265, 1993.
- GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; RICCIARDOLO, M. L.; NADEL, J. A. New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. **Can. J. Pharmacol.**, 73: 843-847, 1995.
- GIBBINS, I. L.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystikinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. **Cell Tissue Res.**, 248: 417-437 1987a.
- GIBBINS, I. L.; WATTCHOW, D.; COVENTRY B. Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. **Brain Res.**, 414: 143-148 1987b.
- GRAVES, G. **Medicinal Plants**, p. 116-118, Randon House, 1996.
- GRIESBACHER, T.; LEGAT, F. J. Effects of FR173657, a non-peptide B₂ antagonist, on kinin-induced hypotension, visceral and peripheral oedema formation and bronconstriction. **Br. J. Pharmacol.**, 120: 933-939, 1997.
- GUPTA, M. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**, Convênio Andres Bello, Ed. Gupta, M. p. 574-576, Colombia, 1995.

- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. In: **Mediators of inflammation**. Eds. Haanen, C.; Vermes, I., P. 4: 5-15, Oxford, London: Rapid Communications of Oxford Ltda, 1995.
- HAGAN, R. M.; MCLEAN, S. Vineyard peptide conference bears fruit. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14: 315-318, 1993.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol. Ther.**, 56 : 131-190, 1992.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors. **Gen. Pharmacol.**, 28: 1-6, 1997.
- HARGREAVES, K. M.; TROULLOS, E. S.; DIONNE, R. A.; SCHMIDT, E. A.; SCHAFER, S. C.; JORIS, J. L. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. **Clin. Pharmacol., Ther.**, 44: 613-621, 1988.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation. **Brazil. J. Med. Biol. Res.** 20: 243-249, 1987.
- HENRIQUES, M. G.; WEG, V. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R.; FERNANDES, P. D.; CORDEIRO, R. S. B.; VARGAFTIG, B. B. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 99: 164-168, 1990.
- HENRIQUES, M. G. Estudo da reação inflamatória induzida por carragenina em camundongos. Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz, p. 1-181, Rio de Janeiro, Brasil. Tese de Doutorado, 1993.
- HERNANDES, A.; SOTO-MOYANO, R.; MESTRE, C.; ESCHÉLIER, A.; PELISSIER, T.; PAEILE, C.; CONTRERAS, E. Intrathecal pertussis toxin but not cyclic AMP blocks kappa opioid-induced antinociception in rat. **Int. J. Neurosci.**, 81: 193-197, 1995.
- HESS, J. F. Molecular pharmacology of kinin receptors. In: **The Kinin System**. Ed. Faramer, S. G., p. 45-55, New York: Academic Press, 1997.
- HESS, J. F.; BORKOWSKI, J. A.; MACNEIL, T.; STONESIFER, G. Y.; FRAHER, J.; STRADER, C. D. Differential pharmacology of cloned human and mouse B₂ bradykinin receptors. **Mol. Pharmacol.**, 45: 1-8, 1994.
- HILL, D. R.; BOWERY, N. G. H-BACLOFEN and H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. **Nature**, 290: 149-152, 1981.

- HOLZER, P. Capsaicin: Cellular targets mechanisms of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43: 144-201, 1991.
- HONG, Y.; ABBOTT, F. V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, 277: 21-28, 1995.
- HOUGHTON, P. J.; MANBY, J. Medicinal plants of the Mapuche. **J. Ethnopharmacol.** 13: 89-103, 1985.
- HUA, X. Y. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta Physiol. Scand.**, 551: 1-44, 1986.
- HUBER, A. R.; KUNKEL, S. L.; TODD, R. F. I. Regulation of transendothelial migration by endogenous interleukin-8. **Science**, 254: 99-102, 1991.
- HUDSPITH, M.J. Glutamate; a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, 78: 731-747, 1997.
- HUGHES, J.H.; SMITH, T. W.; KOSTERLITZ, H.W.; FOTHERGILL, I. A. MORGAN, B.; MORRIS, H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, 258: 577-579, 1975.
- HUGHES, S. R.; BRAIN, S. D. A calcitonin gene-related peptide (CGRP) antagonist (CGRP8-37) inhibits microvascular responses induced by CGRP and capsaicin in skin. **Br. J. Pharmacol.**, 104: 738-742, 1991.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, 14: 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.
- HWANG, J. H.; YAKSH, T. L. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. **Pain**, 70: 15-22, 1997.
- HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, 67: 313-316, 1980.
- INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1614-1620, 1993.

- INSEL, P. Analgesic-antipiretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Eds. Goodman & Gilman's, p. 617-657, New York, McGraw Hill, 1996.
- JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by deservation and by pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol.**, 31: 138-151, 1967.
- JOHNSTON, G. A. R. GABA_A receptor pharmacology. **Pharmacol. Ther.** 69: 173-198, 1996.
- KACZMAREK, L.; KOSSUT, M.; SKANGIEL-KRAMSA, J. Glutamate receptors in cortical plasticity: Molecular and cellular biology. **Physiol. Rev.**, 77: 217-255, 1997.
- KAISER, V.; GUIBAUD, G.; BESSON, J.M. Potent antinociceptive effects of clonidine systematically administered in an experimental model of clinical pain, the arthritic rat. **Brain Res.**, 593: 7-13, 1992.
- KAWABATA, A.; KASAMATSU, K.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. The noradrenaline precursor *L*-Threo-3,4-dihydroxyphenylserine exhibits antinociceptive activity via central α -adrenoceptors in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 503-508, 1994.
- KITA, H.; ABU-GHAZALEH, R. I.; SUR, S.; GLEICH, G.J. Eosinophil major basic protein induces degranulation and production by human eosinophils. **J. Immunol.**, 154: 4749-4758, 1995.
- KITTO, K. F.; HALEY, J. E.; WILCOX, G. L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.**, 148: 1-5, 1992.
- KLUFT, C. Determination of prekallikrein in human plasma-optimal conditions for activating prekallikrein. **J. Lab. Clin. Med.**, 91: 83-95, 1978.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, 298: 249-258, 1994.
- KOWALSKI, M.; KALINER, M. A. Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. **J. Immunol.**, 140: 3905-3911, 1988.
- KROEGEL, C.; VIRCHOW JR, J. C.; LUTTMANN, C.; WALKER, C.; WARNER, J. A. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (part I). **Eur. Respir. J.** 7: 1326-1341, 1994.

- KUCHERA, S.; BARTH, H.; JACOBSON, P.; METZ, A.; SCHAECHTELE, C.; SCHRIER, D. Anti-inflammatory properties of the protein kinase C inhibitor, - [1-[3-(dimethylamino) propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione monohydrochloride (GF109203X) in the PMA-mouse ear model. **Agents Actions**, 39: C169-173, 1993.
- KUHSE, BETZ, H, KIRSCH, J, The inhibitory glycine receptor: architecture synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. **Curr. Opin. Neurobiol.** 5: 318-323, 1995.
- KUMAR, A.; BUSSE, W. Airway inflammation in asthma. **Sci. Med.** 2: 38, 1995.
- LAMAS, A. M.; MULRONEY, C. M.; SCHEIMER, R. P. Studies on adhesive interaction between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. **J. Immunol.**, 140: 1500-1505, 1988.
- LANDUCCI, A. E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by crotafopon, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br. J. Pharmacol.**, 114 (3): 578-583, 1995.
- LANEUVILLE, O.; READERM, A.; COUTURE, R. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminais to produce antinociception in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 159 (3) 273-283, 1989.
- LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 310: 175-183, 1979.
- LEVY, R. A.; PROUDFIT, H. K. The analgesic action of baclofen (β (4-chlorophenyl) γ -aminobutyric acid). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 202: 437-445, 1977.
- LLONA, I.; GALLEGUILLOS, X.; BELMAR, J.; HUIDOBRO-TORO, J. P. Bradykinin modulates the release of noradrenaline from vas deferens nerve terminais. **Life Sci.**, 48: 2585-2592, 1991.
- LLOYD, K. G.; MORSELLI, P. L.. Psychopharmacology of GABAergic drugs. In: **Psychopharmacology: the third generation of progress**, Eds. Herbert; Meltzer, p.183-190, New York, Raven Press, 1987.
- LOLL, P. L.; GARAVITO, R. M. The isoforms of cyclooxygenase: structure and function. **Curr. Opin. Invest. Drugs**, 3: 1171-1180, 1994.

- LUGER, T. A.; SCHUWARZ, T. The role of cytokines and neuroendocrine hormones in cutaneous immunity and inflammation. **Allergy**, 50: 292-302, 1995.
- MAAS, J.; RAE, G.; HUIDOBRO-TORO, J.P.; CALIXTO, J. B. Characterization of kinin receptors modulating neurogenic contractions of the mouse isolated vas deferens. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1471-1477, 1995.
- MACNEIL, T.; BIERILLO, K. K.; MENKE, J. G.; HESS, J. F. Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B₁ receptor. **Biochem. Biophys. Acta Gene Struct. Expres.**, 1264: 223-228, 1995.
- MAGGI, C. A.; PATACHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists. **J. Auton. Pharmacol.**, 13: 23-93, 1993.
- MAGGI, C. A. The mammalian tachykinin receptors. **Gen. Pharmacol.**, 26: 911-944, 1995.
- MALCANGIO, M.; GHELARDINI, C.; GIOTTI, A.; MALMBERG-AIELLO, P.; BARTOLINI, A. CGP 35348, a new GABA_B antagonist prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1303-1308, 1991.
- MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**. 257: 1276-1279, 1992.
- MALMBERG, A. B.; RAFFERTY, M. F.; YAKSH, T. L. Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonist in the formalin test on the rat. **Neurosc. Lett.**, 173: 193-196, 1994.
- MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Capsaicin-evoked prostaglandin E₂ release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, 271: 293-299, 1994.
- MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Effect of continuous intrathecal infusion of ω -conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. **Pain**, 60: 83-90, 1995.
- MANNING, A. M.; ANDERSON, D. C.; BRISTOL, J. A. Eds. **Ann. Reports Med. Chem.**, San Diego, Academic Press, 1994.

- MANTIONE, C. R.; RODRIGUES, R. A bradykinin (BK)₁ receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 99: 516-518, 1990.
- MARCEAU, F. Kinin B₁ receptor: a review. **Immunopharmacology**, 30: 1-26, 1995.
- MARCEAU, F. kinin B₁ receptor induction and inflammation. In: **The Kinin System**. Ed. Farmer, S. G., p. 143-156, New York, Academic Press, 1997.
- MCERCHERN, A. E.; SHELTON E. R.; BHAKTA, S.; OBERNOLTE, R.; BACH, C.; ZUPPAN, P.; FUJISAKA, J.; ALDRICH, R. W.; JARANGIN, K. Expression cloning of rat B₂ receptor. **Proc. Natn. Acad. Sci. (USA)**, 88: 7724-7728, 1991.
- MELLER, S. T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G. F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropatic pain in the rat. **Neuroscience**, 50: 7-10, 1992.
- MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Spinal mediators of hyperalgesia. **Drugs**, 47(5): 10-20, 1994.
- MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**, 60: 367-374, 1994.
- MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G. F. Acute thermal hyperalgesia in the rats is produced by activation of *N*-methyl-D-aspartato receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, 71: 327-335, 1996.
- MENDES, G.L.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; PINHEIRO, T. A.; CALIXTO, J. B. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal injection of polygodial, a sesquiterpene isolated from the Bark of *Drymis winteri*. **Life Sci.**, 1998 (In press).
- MINAMI, T.; NISHIHARA, I.; ITO, S.; SAKAMOTO, K.; HYODO, M.; HAYAISHI, O. Nitric oxide mediates allodynia induced by intrathecal administration of prostaglandin E₂ or prostaglandin F_{2α} in conscious mice. **Pain**, 61: 285-290, 1995.
- MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, 27: 359-367, 1995.

- MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.**, 145: 201-227, 1992.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.
- MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 198-202, 1991.
- MORTON, J. F. **Atlas of medicinal plants in middle America-Bahamas to Yucatan**, ed. Charles C. Thomas, p. 457-463, Springfield, 1981.
- MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **J. Pharmacol. Meth.**, 20: 175-186, 1988.
- NEVES, C. A.; NEVES, P. C. A.; ZANINI, J. C.; MEDEIROS, Y. S.; CALIXTO, J. B. Analgesic and antiinflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **Phytother. Res.**, 7: 356-362, 1993.
- NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. Pain and temperature **The human nervous system-structure and function**. 5 ed., ed. Williams & Wilkins, p.123-137, New York, 1996.
- NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leuk. Biol.**, 54: 171-178, 1993.
- O'CALLAGHAN, J.P.; HOLTZMAN, S. G. Quantification of the analgesic of narcotic antagonists by a modified hot plate procedure. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, 192: 497-505, 1975.
- OCANÁ, M.; BAEYENS, J. M. Differential effects of K⁺channel blockers induced by α_2 -adrenoceptor GABAB and K-opioid receptor agonists. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1049-1054, 1993.
- OPAS, E. E.; BONNEY, R. J.; HUMES, J. L. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol.**, 84: 253-256, 1985.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter function of mammalian Tachykinins. **Am. Soc. Physiol. Rev.**, 73: 229-307, 1993.

- PAIRET, M.; ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutics implications, **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 10: 1-15, 1996.
- PAUL, S. M. GABA and Glycine. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. Eds. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer, New York: Raven Press. Ltd., 1995.
- PIEDIMONTE, G. Tachykinin peptides, receptors, and peptidases in airway disease. **Exp. Lung Res.**, 21: 809-834, 1995.
- PRUZANSKI, W.; VADAS P. Phospholipase A₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. **Immunol. Today**, 12: 143-146, 1991.
- RAFFA, R. B.; MARTINEZ, R. P. The "glibenclamide-shift" of centrally-acting antinociceptive agents in mice. **Brain Res.**, 677: 277-282, 1995.
- RAHMAN, A. F.; TAKAHASHI, M.; KANETO, H. Role of GABAergic systems in the development of morphine tolerance in formalin-treated mice. **Jpn. J. Pharmacol.**, 68 (2): 207-211, 1995.
- REEVE, A. J.; DICKENSON, A. H.; The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive response of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 2221-2228, 1995.
- REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32: 1-46, 1980.
- REGOLI, D.; GOBIEL, F.; NGUYEN, Q. T.; JUKIC, D.; SEONE, P. R.; SALVINO, J. M.; SAWUTZ, D. G. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. **Life Sci.**, 55: 735-749, 1994.
- RICCIERI, T. M. N. **Bibliografia de plantas medicinais**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1: 224, 1981.
- ROCHA E SILVA, M. O. Brief history of inflammation In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Eds. Vane, J. R.; Ferreira S. H., p. 6-25, New York: Springer-Verlag, 1978.
- ROSLAND, J. H.; TjøLSEN A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, 42: 235-242, 1990.
- ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, 45 : 211-216, 1991.

- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, 31: 1279-1285, 1992.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neurosci. Lett.**, 151, 142-145, 1993.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, 29: 271-278, 1996.
- SAKURADA, T.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; KISARA, K. Neurokinin receptor antagonists. Therapeutic potential in the treatment of pain syndromes. **CNS Drugs**. 8 (6): 436-447, 1997.
- SALEH, T.F. Análise dos efeitos de medicamentos antiasmáticos, da bradicinina e da substância P no modelo experimental da pleurisia em camundongos. Departamento de Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1-156, Florianópolis, Brasil. Tese de Mestrado. 1996.
- SÁNCHEZ-BLASQUEZ, P.; GARZÓN J. Cholera toxin and pertussis toxin on opioid- and α_2 - mediated supraspinal analgesia in mice. **Life Sci.**, 48: 1721-1727, 1991.
- SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.**, 26: 1499-1506, 1995.
- SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, 31(4): 381-389, 1997.
- SAWYNOK, J.; LABELLA, F. S. On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. **Neuropharmacology**, 21: 392-403, 1982.
- SAWINOK, J. GABAergic mechanisms in antinociception. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.** 8 (4-6): 581-586, 1984.
- SCHLUGER, N. W.; ROM, W. N. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. **Curr. Op. Immunol.**, 9: 504-508, 1997.

- SCHRÖDER, J. M.; STICHERLING, M.; SMID, P.; CHRISTOPHERS, E. Interleukin-8 and structurally related cytokines. In: **Epidermal growth factors and cytokines**. Eds. Luger, T. A.; Schwarz, T., p. 89-112, New York, Marcei Dekker, 1993.
- SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBI, D. A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: **Handbook of inflammation**. Eds. Bonta, I. L. , Bray, M. A.; Parnham, M. J., p. 27-47, New York: Elsevier, 1985.
- SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBI, D. A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: **Textbook of Immunopharmacology**. Eds. Dale, M. M.; Foreman, J. C., p. 253-261, Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1989.
- SHAFIZADEH, M.; SEMNANIAN, S.; ZARRINDAST, M. R.; HASHEMI B. Involvement of GABAB receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. **Gen. Pharmacol.**, 28(4): 611-615, 1997.
- SHEWADE, D. G.; RAMASWAMY, S. Prolactin induced analgesia is dependent on ATP sensitive potassium channels. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 22: 635-636, 1995.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38: 347-352, 1989.
- SIBILLE, Y.; REYNOLDS, H. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **Am. Rev. Resp. Dis.**, 141: 471-501, 1990.
- SIEGMUND, E. A.; CADMUS R. A.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 95: 729-731, 1957a.
- SIEGMUND, E. A.; CADMUS, R. A.; LU, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 119: 184-193, 1957b.
- SIMÕES, C M. O.; MENTZ, L.A. SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. ed. UFRGS, p. 46-47, Porto Alegre, 1986.
- SIVAM, S. P.; HO I. K. GABAergic drugs, morphine and morphine tolerance: a study in relation to nociception and gastrointestinal transit in mice. **Neuropharmacology**, 22: 767-774, 1983.

- SPECTOR, W. G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J. Pathol. Bact.**, 72: 367-380, 1956.
- STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75: 217-227, 1995.
- STANDIFER, K. M.; PASTERNAK, G. W. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. **Cell. Signal.**, 9: 237-248, 1997.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid receptors: New insights enhance potencial as a therapeutic target. **Pain**, 68: 195-208, 1996.
- SZOLCSANYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors on the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. **J. Physiol.**, 388: 9-23, 1987.
- TABER, R. I.; GREENHOUSE, D. D.; IRWIN, S. Inhibition of phenylquinone-induced writhing by narcotic antagonists. **Nature**, 204: 189-190, 1964.
- TABER, R. I.; LATRANYI, M. B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). **Eur. J. Pharmacol.**, 75: 215-222, 1981.
- TANAKA, K.; KATO, T.; MATSUMOTO, K.; YOSHIDA, T. Antiinflammatory action of thielocin A1 β , a group II phospholipase A₂ specific inhibitor, in rat carrageenan-induced pleurisy. **Inflammation**, 17: 107-119, 1993.
- TASKER, R. A. R.; CONNELL, B. J.; YOLE, M. J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. **Pain**, 49: 383-391, 1992.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.
- TOCKER, J. E.; DURHAM, S. K.; WELTON, A. F.; SELIG, W. M. Phospholipase A₂-induced pulmonary and hemodynamic responses in the guinea-pig. Effect of enzyme inhibitors and mediator antagonists. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 142: 1193-1199, 1990.
- TRATSK, K. S.; CAMPOS, M. M.; VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflamm. Res.**, 1998 (In press).

- TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; MULAS, G.; BIANCHI, P.; DEL NEGRO, P.; DELLA LOGGIA, R. In the croton oil ear test the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents Actions**, 19: 371-373, 1986.
- UHLÉN, S.; PERSON, M. L.; ALARI, L.; POST, C.; AXELSSON, K. L.; WIKBERG, J. E. S. Antinociceptive actions of α_2 adrenoceptor agonists in the rat spinal cord: Evidence for antinociceptive α_2 adrenoceptors from cyclic AMP. **J. Neurochem.**, 55: 1905-1914, 1990.
- VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, 55: 391-304, 1993.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, 25: 9-21, 1996.
- VAN WAUVE, J. P.; GOOSSENS, J. G. Dextran-induced edema formation in mouse ear: a pharmacological evaluation. **Drug Develop. Res.**, 8: 213-218, 1986.
- VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278: 304-312, 1996.
- VERGE, V. M.K. ; XU, Z.; XU, X-J.; WIESENFELT-HALLIN, Z.; HOKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. **Proc. Natn. Acad. Sci., (USA)**. 89: 11617-11621, 1992.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed. Proc.**, 46: 118-126, 1987.
- VON EULER, U. S.; GADDUM, J. H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J. Physiol.**, 72: 74-86, 1931.
- VONVOIGTLANDER, P. F.; LEWIS, R. A. NEFF, G. L. kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 231: 270-274, 1984.
- XIN-QUAN, J.; ZING-ZU, Z. Possible involvement of nitric oxide in arginine-induced analgesia. **Acta Pharmacol. Sin.**, 14: 289-291, 1993.

- WALL, P. D. Inflammatory and neurogenic pain: new molecules, new mechanisms. **Br. J. Anaesth.**, 75, 1995.
- WALTON, J.G.; THOMPSON, J.W.; SYMOUR, R. A. (Eds). The pharmacology of pain. **Textbook of Dental Pharmacology and Therapeutics**, p. 49-65, Oxford: Oxford Medical Publications, 1994.
- WARNER, J. A.; KROEGEL, C. Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. **Eur. Respir. J.** 7: 1326-1341, 1994.
- WEGNER, C. D.; GUNDEL, R. H.; REILLY, P.; HAYNES, N.; LETTS, G.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. **Science**, 247: 456-459, 1990.
- WHALLEY, E. T. Receptors mediating the increase in vascular permeability to kinins: comparative studies in rat, guinea-pig and rabbit. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 336: 99-104, 1987.
- WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmacol.**, 3: 369-378, 1964.
- WIMALAWANSA, S. J.; MACINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide and its specific binding sites in the cardiovascular system. **Int. J. Cardiol.**, 20: 29-37, 1988.
- WOLFE, S. L.; HORROCKS, L. A. Eicosanoids. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Eds. Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P. B., et al., p. 475-498, New York: Raven Press Ltd, 1994.
- WOOLFE, G.; MAC DONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, 80: 300-307, 1944.
- WU, J.; LIN, Q.; MCADOO, D. J.; WILLIS, W. D. Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin. **Neuroreport**, 9: 589-592, 1998.
- YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, 202: 411-428, 1977.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA

antagonists, on the formalin test in the rat. **Anesthesiology**, 77: 757-763, 1992.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Effects of FK224, a novel cyclopeptide NK1 AND NK2 antagonist, and CP-96,345, a nonpeptide NK1 antagonist, on development and maintenance of thermal hyperesthesia evoked by carrageenan injection in the rat paw. **Anesthesiology**, 79: 1042-1050, 1993.

ZANINI, J. C.; MEDEIROS, Y. S.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. R. A.; CALIXTO, J. B. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Phytother. Res.**, 6: 1-5, 1992.

ZIMER, P. O.; WYNN, R. L.; FORD, R. D.; RUDO, F. G. Effect of hot plate temperature on the antinociceptive activity of mixed opioid antagonist compounds. **Drug. Dev. Res.**, 7 277-280, 1986.

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