

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de  
*Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos  
de inflamação e dor**

**KATHRYN ANA BORTOLINI SIMÃO DA SILVA**

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

Orientador: Giles Alexander Rae

Florianópolis – SC

2007

Simão da Silva, Kathryn Ana Bortolini. **Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor.** Florianópolis, 2007. 94 p. Dissertação (mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós – Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

**Orientador:** Prof. Dr. Giles Alexander Rae

**Defesa:** 26/02/2007.

Este estudo investigou a influência do plumierídeo (PL), um iridóide isolado da espécie vegetal *A. cathartica*, em inibir as respostas inflamatória e nociceptiva, em diferentes modelos experimentais. Uma única administração oral do PL (0,0001-1 µg/kg), inibiu o edema induzido por carragenina na 1ª fase em camundongos e em ambas as fases em ratos, com efeito prolongado ( $\cong$  6 h). Quando administrado por via s.c. (0,1–100 µg/kg), o PL foi efetivo em inibir o edema induzido por carragenina, dextrana, zimossano e formalina, em camundongos. Estes efeitos foram similares aos da dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.). Demonstrou-se eficaz em inibir o edema de orelha induzido por óleo de cróton, ácido araquidônico, PGE<sub>2</sub>, em camundongos e induzido por carragenina, bradicinina e anafilotoxina C5a em ratos. Também foi eficaz ao inibir a atividade da MPO, bem como a migração de neutrófilos para a cavidade pleural. Contra a resposta inflamatória persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA, o PL foi eficaz em inibir o edema, nos dois esquemas de tratamento realizados (pré e pós), demonstrando um efeito duradouro. Surpreendentemente, o PL apesar de não inibir a dor referida induzida por formalina, inibiu a hipernocicepção térmica gerada após a constrição do nervo infraorbital, bem como a hipernocicepção mecânica induzida por CFA. O conjunto de resultados sugere que estas ações do PL possam decorrer de sua interferência com mecanismos de sinalização celular mediadas por bradicinina, PGE<sub>2</sub> e/ou C5a, bem como de potente efeito inibitório sobre mecanismos de migração de leucócitos. Entretanto, os resultados conduzidos até o momento são ainda insuficientes para esclarecer os verdadeiros alvos de ação deste composto. Estudos adicionais que venham determinar seus mecanismos de ação podem resultar no desenvolvimento de uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da inflamação e dor.

## *Agradecimentos*

*Agradeço a Deus por sempre me guiar no caminho do bem. Sem a fé, muitas vezes falha, e sem ele este momento não seria possível.*

*Agradeço à minha mãe, Erica, por sempre me incentivar a trilhar os caminhos da ciência, mesmo quando obstáculos os obstruíam. Muito obrigado! Sem você, com certeza não chegaria até aqui.*

*Aos meus sogros, Mercedes e Ailton, pelo incentivo e por terem me acolhido como “uma nova filha”.*

*Ao meu marido, Eduardo, um obrigado especial, pela paciência, dedicação e amor, presentes em todos os dias de minha vida. Você me ensinou a “descomplicar” a vida. Obrigado por estar sempre ao meu lado!*

*Aos meus amigos, Josiane e Mauro, Thaíze e Fernando, agradeço pelo apoio e incentivo e pela compreensão nos momentos de ausência.*

*Agradeço, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Giles, pela amizade, paciência, dedicação e valiosa orientação, nestes 3 anos de convivência.*

*Agradeço aos Professores Doutores Fernando de Queiroz Cunha, João Batista Calixto e Rosa Maria Ribeiro do Valle, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta Dissertação de Mestrado, contribuindo substancialmente para melhoria deste trabalho.*

*Agradeço a todos os Professores do departamento por terem compartilhado comigo seus conhecimentos e em especial ao Prof. João Batista Calixto, por permitir a utilização de seu laboratório para realização de ensaios bioquímicos.*

*Um obrigado especial aos Professores José Eduardo da Silva Santos e Ângela Malheiros por terem me proporcionado o ingresso no meio científico, já durante a graduação.*

*Agradeço também ao Professor Dr. Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química, pelo apoio fornecido durante o isolamento do composto Plumierídeo.*

*Agradeço aos “Ex” colegas de laboratório: Patrícia, Marcília, Janice e Juliana, pela amizade e por terem acompanhado o início deste trabalho. Aos “atuais”: Emerson, Amélia, Maria Fernanda, Rafaela e Leandro pelo companheirismo e sugestões dadas ao longo destes dois anos de convivência.*

*Agradeço a todos os colegas do curso de Pós Graduação e em especial aos amigos Jarbas Mota Siqueira Jr. e Ana Flávia Paszcuk, pela amizade e pela colaboração em alguns experimentos.*

*A todos os funcionários do biotério, pelo cuidado e carinho despendido aos animais, em especial ao Pedro, por sua solicitude.*

*As secretárias Diana e Rita, por sempre estarem dispostas a nos atender.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.*

*Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste projeto.*

*Muito Obrigado!!*

*Ao meu namorado, hoje também  
esposo, Eduardo, pelo amor sempre  
presente, dedicação constante, paciência,  
incentivo em todos os momentos da  
realização deste projeto. A você meu  
eterno amor e agradecimento.*

*Em toda vida humana surge um momento supremo...*

*Um dia, uma noite, uma manhã, uma tarde, uma hora decisiva, um instante oportuno...*

*Uma festa através da qual a pessoa vislumbra coisas maravilhosas e sublimes...*

*Um quase nada que balança, cujos pratos são:*

*“O demasiado cedo”*

*“O demasiado tarde”*

*Feliz é quem sabe esperar... e que de pé, à proa da barca da vida, espere e vigie pronto a aproveitar o momento em que a ocasião estender a sua mão... Quando o relógio do seu destino soar o “Agora”...*

*Tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

*(Autor desconhecido)*

<b>Lista de Figuras</b> .....	I
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	III
<b>Resumo</b> .....	V
<b>Abstract</b> .....	VI
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Resposta Inflamatória</b> .....	2
<b>1.2. Dor e Nocicepção</b> .....	5
<b>1.3. Plantas medicinais como fonte de novas drogas: o potencial da <i>Allamanda cathartica</i></b> .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	15
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	16
<b>2.2. Objetivos Gerais</b> .....	16
<b>3. Matérias e Métodos</b> .....	18
<b>3.1. Materiais</b> .....	19
<b>3.1.1. Animais</b> .....	19
<b>3.1.2. Isolamento e Identificação Química do Composto Plumierídeo</b> .....	19
<b>3.1.3. Drogas e Soluções</b> .....	20
<b>3.2. Procedimentos Experimentais</b> .....	22
<b>3.2.1. Modelos Experimentais de Inflamação</b> .....	22
<b>3.2.1.1. Edema de Pata</b> .....	22
<b>3.2.1.2. Edema de Pata Persistente induzido por CFA</b> .....	23
<b>3.2.1.3. Edema de Orelha</b> .....	24
<b>3.2.1.4. Pleurisia</b> .....	25
<b>3.2.2. Modelos Experimentais de Dor</b> .....	26
<b>3.2.2.1. Nocicepção Induzida por Formalina</b> .....	26
<b>3.2.2.2. Hipernocicepção mecânica induzida pelo CFA</b> .....	27
<b>3.2.2.3. Indução da dor neuropática –constricção do nervo infaorbital</b> .....	29

<b>3.3. Análise e Estatística.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Influência do Composto Plumierídeo nas Respostas Inflamatórias em diversos Modelos Experimentais.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.1. Influência do Tratamento Sub-Cutâneo ou Oral com o Plumierídeo sobre o edema de pata induzido por diversos agentes flogísticos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2. Influência do Tratamento Oral com o Composto Plumierídeo sobre o Edema de Pata Persistente Induzido por CFA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.3. Influência do Tratamento Tópico ou Oral com o Composto Plumierídeo sobre o Edema de Orelha.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4. Influência do Tratamento com o Composto Plumierídeo sobre a migração celular presente no decorrer do processo inflamatório.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Influência do Plumierídeo na Nocicepção.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.1. Influência do Tratamento com o Composto Plumierídeo sobre a nocicepção induzida por Formalina.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.2. Influência do tratamento com o composto plumierídeo sobre a hipernocicepção mecânica induzida pelo Ajuvante Completo de Freund (CFA).....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3. Influência do tratamento com o Plumierídeo sobre a hipernocicepção mecânica e térmica no modelo de constrição do nervo infraorbital.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>59</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>74</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>77</b>

<b>Figura 1:</b> Espécie Vegetal <i>Allamanda cathartica</i> .....	11
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do composto iridóide plumierídeo.....	12
<b>Figura 3:</b> Influência do tratamento sub-cutâneo com o plumierídeo sobre o edema de pata em camundongos.....	36
<b>Figura 4:</b> Influência do tratamento sub-cutâneo com o plumierídeo sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de formalina.....	37
<b>Figura 5:</b> Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de carragenina em ratos.....	38
<b>Figura 6:</b> Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de pata persistente induzido pela injeção i.pl. de CFA.....	40
<b>Figura 7:</b> Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de óleo de cróton.....	43
<b>Figura 8:</b> Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de ácido araquidônico.....	44
<b>Figura 9:</b> Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de PGE <sub>2</sub> .....	45
<b>Figura 10:</b> Influência do tratamento oral com o plumierídeo no edema de orelha induzido pela injeção intra-dérmica de diversos mediadores inflamatórios.....	46
<b>Figura 11:</b> Influência do tratamento oral com o plumierídeo no edema de orelha induzido pela injeção intra-dérmica de diversos mediadores inflamatórios.....	47
<b>Figura 12:</b> Influência do tratamento sub-cutâneo com o plumierídeo sobre a pleurisia induzida por carragenina.....	50
<b>Figura 13:</b> Influência do tratamento oral com o composto iridóide plumierídeo sobre o aumento da atividade da MPO.....	51
<b>Figura 14:</b> Efeito do tratamento por via oral com o plumierídeo ou cloridrato de morfina sobre a primeira e a segunda fase da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina em camundongos.....	52

<b>Figura 15:</b> Influência do tratamento com o composto plumierídeo sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	54
<b>Figura 16:</b> Influência do tratamento oral com o composto plumierídeo na hipernocicepção ao frio em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital.....	56
<b>Figura 17:</b> Influência do tratamento oral com o composto plumierídeo na hipernocicepção ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital de ratos.....	57
<b>Figura 18:</b> Influência do tratamento oral com o composto plumierídeo na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital de ratos.....	58

**µg** – microgramas

**µl** – microlitros

**CEUA** – comitê de ética para o uso de animais

**CFA** – adjuvante completo de Freund

**CGRP** - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**cm** – centímetros

**CO<sub>2</sub>** – gás carbônico

**COX** - ciclooxigenase

**E.P.M.** - erro padrão da média

**g** – gramas

**h** – hora

**HIV** - vírus da imunodeficiência humana

**i.m.** – intra-muscular

**iNOS** – óxido nítrico sintetase induzida

**i.p.** – intra-peritoneal

**i.pl.** - intra-plantar

**IASP** - Associação Internacional para o Estudo da Dor

**Kg** – quilograma

**LTs** – leucotrienos

**mg** - miligrama

**min**- minutos

**mm** - milímetros

**MPO** – mieloperoxidase

**NGF** – Fator de crescimento neural

**nm** - nanômetros

**nmol** – nanomol

**PAF** - fator de ativação de plaquetas

**PBS** - solução tampão fosfato

**PGE<sub>2</sub>** – prostaglandina E<sub>2</sub>

**PGs** – prostaglandinas

**PL** – plumierídeo

**s** - segundos

**SNC** – sistema nervoso central

**TNF** - fator de necrose tumoral

**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina

Este estudo investigou a influência do plumierídeo (PL), um iridóide isolado da espécie vegetal *Allamanda cathartica*, em inibir as respostas inflamatória e nociceptiva em diferentes modelos experimentais. Uma única administração oral do PL (0,0001-1 µg/kg) inibiu o edema de pata induzido por carragenina em e em ratos, com efeito prolongado. Quando administrado por via s.c. (0,1–100 µg/kg), o PL foi efetivo em inibir o edema induzido por carragenina, dextrana, zimosano e formalina, em camundongos. Estes efeitos foram similares aos produzidos pela dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.). O PL demonstrou-se ainda eficaz em inibir o edema de orelha induzido por óleo de cróton, ácido araquidônico e PGE<sub>2</sub> em camundongos, e por carragenina, bradicinina e anafilotoxina C5a em ratos. O iridóide PL também inibiu o aumento da atividade da MPO, bem como a migração de neutrófilos induzida por carragenina na cavidade pleural. Contra a resposta inflamatória persistente induzida pela injeção i.pl. de CFA, o PL foi eficaz em inibir o edema, nos dois esquemas de tratamento realizados (pré e pós-CFA), demonstrando um efeito duradouro. Surpreendentemente, apesar de não interferir com a dor referida induzida por formalina, o PL inibiu a hipernocicepção neuropática orofacial térmica observada após a constrição do nervo infraorbital, bem como a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida na pata por CFA. O conjunto de resultados sugere que estas ações do PL possam decorrer de sua interferência com mecanismos de sinalização celular mediadas por bradicinina, PGE<sub>2</sub> e/ou C5a, bem como de potente efeito inibitório sobre mecanismos de migração de leucócitos. Entretanto, os resultados conduzidos até o momento são ainda insuficientes para esclarecer os verdadeiros alvos de ação deste composto. Estudos adicionais que venham determinar seus mecanismos de ação podem resultar no desenvolvimento de uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da inflamação e dor.

We investigated the influence of plumieride (PL), an iridoid isolated from *Allamanda cathartica*, on inhibiting the inflammatory and nociceptive responses, in several experimental models. A single oral administration of PL (0.0001-1 µg/kg) inhibited paw oedema induced by carrageenan in both mice and rats. When injected subcutaneously in mice (0.1–100 µg/kg), PL was effective in inhibiting paw oedema induced by carrageenan, dextran, zimosan and formalin. These effects were similar to those observed for dexametasone (0,5 mg/kg; s.c.). It was also shown that PL effectively inhibited ear oedema caused by croton oil, araquidonic acid and PGE<sub>2</sub> in mice and by carragenan, bradykinin and anafilotoxin C5a in rats. As well as the increase in myeloperoxidase activity and neutrophil migration induced by carrageenan in the pleural cavity. PL was effective in causing long-lasting inhibition of persistent hind paw induced by i.pl. injection of CFA in mice, using two treatment protocols (pre-CFA and post-CFA. Surprisingly, although PL did not inhibit referred pain induced by formalin, it did inhibit neuropathic orofacial thermal hypernociception caused by infraorbital nerve constriction, as well as inflammatory hind paw mechanical hypernociception induced by CFA. Taken together, these results suggest that PL exerts potent anti-inflammatory actions, possibly interfering with the cellular signaling mechanisms mediated by bradykinin, PGE<sub>2</sub>, and/or C5a, as well as through inhibition of leucocyte migration. However, the present results are still insufficient to clarify the real target of PL action. Additional studies to determine its mechanisms of action may reveal a new and important target for more effective treatment of inflammation and pain.



### **1.1. Resposta Inflamatória**

A inflamação constitui um processo homeostático desencadeado pelo organismo após lesão tecidual ou infecção local, e como consequência pode ocasionar reparo da lesão, ou o isolamento ou a destruição do agente agressor, e a ativação dos mecanismos de reparo necessários para garantir o restabelecimento das suas funções normais (Levy, 1996).

Esta resposta inflamatória aguda consiste em dois componentes: uma reação inata, não imunológica, que engloba os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos; e uma resposta imune, a qual é adquirida e específica, tornando a resposta de defesa a um microorganismo invasor mais eficaz (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 2005).

Como dito anteriormente, a reação inata envolve os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos e podem ser divididos em vasculares e celulares. Os eventos vasculares compreendem a vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo local, o aumento da permeabilidade vascular e a exsudação plasmática. Tais eventos são importantes na medida em que promovem um aumento local da concentração de mediadores de origem plasmática, entre eles os componentes do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e das cininas. Concomitantemente, são desencadeados os eventos celulares, onde há a saída de leucócitos circulantes da luz do vaso e sua migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração (Munro, 1993; Springer, 1994; Wahl *et al.*, 1996). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas

células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (Springer, 1994; Weber, 2003). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações fagocíticas e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, e logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (Broche & Tellado, 2001).

Estas alterações bioquímicas e celulares são finamente reguladas pela liberação imediata e seqüencial de moléculas solúveis e difusíveis, denominadas mediadores inflamatórios, os quais são produzidos principalmente por células inflamatórias (Sharma & Buchanan, 1994).

A resposta inflamatória é, portanto, iniciada e conduzida por estes mediadores que podem ser de origem celular e também por aqueles de origem plasmática que vão promover os sinais característicos desta resposta: **dor, calor, rubor e tumor**, que podem vir acompanhados ou não da **perda de função** do tecido ou órgão afetado (Rocha & Silva, 1978).

Dentre os mediadores inflamatórios, podemos destacar produtos da degranulação de mastócitos, como a histamina e a serotonina, responsáveis durante o desenvolvimento de um processo inflamatório, pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; componentes do sistema complemento, destacando as anafilotoxinas C3a e C5a, importantes na estimulação da secreção de mediadores por mastócitos e a C5a também exerce um importante papel quimiotático; mediadores lipídicos, como os leucotrienos, as prostaglandinas e o fator de ativação plaquetária, os quais são derivados da metabolização do ácido araquidônico pelas enzimas ciclooxigenase ou lipooxigenase, importantes mediadores no processo inflamatório. (para revisão ver: Herschmam, 1996; Gonzalez-Rey *et al.*, 2007;). As citocinas, numerosa família de peptídeos que incluem interferons, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), vários fatores de crescimento e as quimiocinas. A bradicinina, também destaca-se entre os mediadores químicos, envolvidos no processo inflamatório, promovendo vasodilatação, extravasamento plasmático e aderência de neutrófilos (Calixto *et al.*, 2004a). Além destes, mediadores peptídicos, como as neurocininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), dentre outros, também exercem um importante papel no processo inflamatório (Okajima & Harada, 2006).

Por outro lado, a resposta imune adquirida específica, trata-se de uma resposta mais complexa, que melhora acentuadamente a eficácia das respostas inatas não imunológicas. Esta resposta envolve principalmente linfócitos, que podem ser divididos em três principais grupos: as células B, responsáveis pela produção de anticorpos; as células T, importantes na fase de inibição da resposta imune e as células Natural Killer, ativas durante a resposta inata não imunológica.

Assim, a reação inflamatória manifesta-se clinicamente como um fenômeno estereotipado e independente da natureza do agente agressor, mediado por vários fatores, podendo ocorrer somente pequenas variações em determinadas situações, dependentes do tecido ou órgão afetado, e da coexistência de estados patológicos, que alterariam a capacidade do organismo de mobilizar as fontes de defesa (Sedgwick & Willoughby, 1985).

### **1.2. Dor e Nocicepção**

A dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução da informação gerada pelo estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983), a dor é uma experiência sensorial e emocional associada com potenciais ou reais lesões, tem uma conotação individual e sofre influências de experiências anteriores. Já o termo “nocicepção” refere-se somente a percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (os nociceptores), existentes no local da lesão (Fürst, 1999).

A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão (Cheng *et al.*, 2002).

A dor se inicia em áreas periféricas: pele, órgãos internos ou qualquer região fora do sistema nervoso central, isto é, fora do cérebro e da medula espinhal. Sendo assim, neste contexto, dar uma topada com o dedão do pé ou encostar a mão em uma chapa quente são eventos que ativam neurônios conhecidos como nociceptores, que reagem especificamente a estímulos danosos, como temperaturas

ou pressão mecânica extremas e substâncias produzidas pelo organismo em resposta a uma lesão ou inflamação. (Basbaum & Julius, 2006).

As fibras nociceptivas possuem duas extremidades: uma delas, a que detecta sensações, se projeta para regiões periféricas onde inerva pequenas porções de tecido; a segunda extremidade estende-se até o interior do corno medular espinal dorsal. O corpo celular dos nociceptores fica entre esses dois segmentos, em uma estrutura fora da medula espinal. Quanto o agente nocivo é detectado pela extremidade periférica, na pele ou algum outro órgão, um impulso elétrico é disparado e propagado por toda a fibra nervosa até atingir uma região da medula espinal (Basbaum & Julius, 2006).

A sensação dolorosa é comumente acompanhada de alterações sensoriais descritas na literatura como hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso), alodínia (dor evocada por um estímulo previamente não nocivo) (Besson, 1999).

Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (para revisão ver: Carr & Goudas, 1999; Park & Vasko, 2005). Por outro lado, a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, se caracteriza em relação à persistência e alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (para revisão ver: Iadarola e Caudle, 1997; Besson, 1999).

O conhecimento da biologia molecular acerca dos diversos receptores e vias transduccionais envolvidos na gênese da nocicepção estão permitindo um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos

neurotransmissores e, conseqüentemente, de drogas que atuam na modulação central e periférica da nocicepção. Os mecanismos envolvidos na transdução neuroquímica da dor geralmente envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos com canais iônicos de membrana dependente de voltagem, canais iônicos operados por receptor, receptores associados à tirosina quinase, ou com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas G (para revisão ver: Levine & Taiwo, 1994; Rang *et al.*, 1994; Wood & Docherty, 1997; Millan, 1999; Park & Vasko, 2005).

Os neutrófilos, os eosinófilos, os mastócitos, os macrófagos dentre outras células são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos como histamina, serotonina, PGs, leucotrienos (LTs), PAF, citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e numerosas proteases entre outros (Ferreira & Nakamura, 1979a ; 1979b; Ferreira, 1981; Baccaglini & Hogan, 1983; Tonussi & Ferreira, 1994). Estes mediadores podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor.

A dor pode ainda ser classificada como nociceptiva, neurogênica, neuropática ou psicogênica, quando associada à estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neuronal na periferia ou a nível central, disfunção/dano de um nervo ou mais, e fatores psicológicos, respectivamente (Millan, 1999). Por outro lado, Woolf & Salter (2000) enquadram os tipos de dor em fisiológica (quando há ativação direta dos nociceptores), inflamatória (provocada por danos teciduais) e neuropática (provocada por lesão de células do sistema nervoso central).

A dor neuropática pode resultar de lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso. Esta dor caracteriza-se por dor espontânea,

provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos (hiperalgesia). O termo hipernocicepção refere-se à sensibilização dos nociceptores, isto é, a diminuição do seu limiar de ativação, e tem sido empregado para designar alodinia ou hiperalgesia em animais de experimentação (Cunha et al., 2004).

Embora sua etiologia seja bastante variada, incluindo trauma, desordens metabólicas e vasculares, infecções virais ou bacterianas, entre outros fatores, o denominador comum destas patologias é o dano neural, o qual é seguido por algumas alterações que também parecem ser comuns a diversos tipos de dor neuropática (Devor, 2006). No sistema nervoso periférico, as principais conseqüências da lesão de nervos são alterações na excitabilidade e no fenótipo das fibras aferentes primárias. Estes fenômenos vão contribuir para as alterações que ocorrem no SNC, que incluem: excitabilidade aumentada, inibição diminuída e reestruturação organizacional das células (para revisão ver: Dickenson et al., 2002; Woolf, 2004).

Neurônios sensoriais lesionados, ou fibras próximas a eles, podem desenvolver alterações na sua excitabilidade suficientes para gerar potenciais de ação ectópicos (Chen & Devor, 1998; Liu *et al.*, 2000). Estes podem resultar da desmielinização e/ou do aumento da expressão de canais de sódio e diminuição da expressão de canais de potássio (Waxman *et al.*, 1999).

Diante da complexidade dessas patologias mencionadas anteriormente e com o intuito de alcançar novos alvos terapêuticos, os produtos naturais tornam-se fonte de matéria prima para atingir este objetivo.

### **1.3. Plantas Medicinais como fonte de novos fármacos: o potencial da *Allamanda cathartica*.**

As plantas, de uma maneira geral, são responsáveis pela síntese de diversos produtos naturais, devido principalmente a produção de metabólitos secundários (Wink, 2003). Alguns destes metabólitos secundários são mecanismos essenciais para sobrevivência da espécie, sendo utilizados como mecanismo para atrair polinizadores ou como mecanismo de defesa contra fungos e predadores. (Flores *et al.*, 1999; Julsing *et al.*, 2006). Ou ainda, quando liberados das raízes podem contribuir para a competitividade contra espécies invasoras (Flores *et al.*, 1999; Bertin *et al.*, 2003; Inderjit & Duque, 2003; Bais *et al.*, 2006).

Sendo assim, fica claro que estes metabólitos exercem funções importantes e que podemos perfeitamente relacionar o termo “produtos naturais” com “metabólitos secundários”. Isto deixa claro também que necessitamos de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na possível formulação de medicamentos.

O maior obstáculo ainda existente para a utilização terapêutica de produtos naturais ou seus derivados no tratamento convencional de diversas doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e segurança. Mesmo com este fator importante, nas últimas décadas verificou-se um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais, embora a preferência das grandes indústrias farmacêuticas continuasse sendo pelo desenvolvimento de medicamentos pela via sintética (Calixto *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; Koehn & Carter, 2005). Mas é importante salientar que cerca de 49% das drogas ou análogos

semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos, desenvolvidas entre 1981 a 2001 foram obtidos a partir de produtos naturais (Koehn & Carter, 2005).

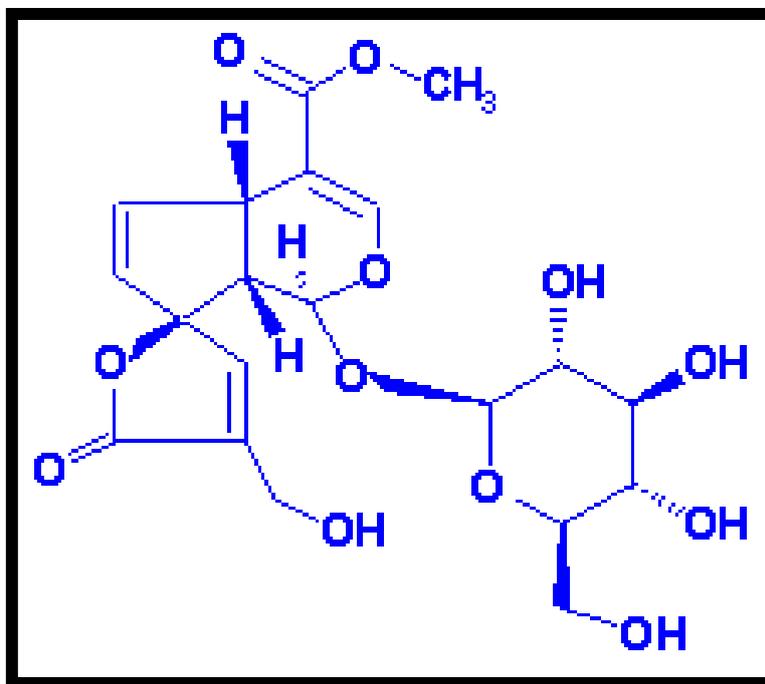
Assim, na terapêutica moderna, as plantas medicinais fornecem o substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem às entidades químicas. Dentro deste contexto, o Brasil é um país privilegiado, por apresentar a biodiversidade do mundo, detendo cerca de 23% do total de espécies existentes no planeta (Rates, 2001).

Como as principais categorias de metabólitos secundários que apresentam compostos biologicamente ativos, dos quais são derivados alguns medicamentos, podemos destacar: os glicosídeos, os alcalóides os terpenóides, falvonóides e os iridóides (Rates, 2001).

Entre as inúmeras espécies vegetais utilizadas na medicina popular brasileira (Calixto *et al.*, 2003; 2004b; Basso *et al.*, 2005), está a *Allamanda cathartica*. Esta espécie vegetal (Figura 1) pertence à família Apocynaceae e foi catalogada no ano de 1771 por Carl Linnaeus, e encontra-se registrada no Herbário Internacional de Berlin, sob o número 4.831. Espécies pertencentes a este gênero são trepadeiras, comum nas regiões mais quentes do Brasil, e algumas são utilizadas na medicina popular como purgativo, contra tumores hepáticos e afecções de baço (Shen *et al.*, 1986).



**Figura 1:** Espécie vegetal *Allamanda cathartica*.



**Figura 2:** Estrutura química do composto iridóide, Plumierídeo.

Até o momento, quatro espécies do gênero *Allamanda* foram estudadas quanto aos seus constituintes químicos, das quais foram isolados esteróides (Agrawal *et al.*, 1985), terpenóides (Jewers *et al.*, 1971; Agrawal *et al.*, 1985), flavonóides, cumarinas, lignanas (Abe *et al.*, 1988) e iridóides (Jewers *et al.*, 1971; Coppen *et al.*, 1983; Malheiros *et al.*, 1997).

Constatou-se a atividade fungicida dos compostos isoplumericina, plumierídeo e fulvoplumierina (Jewers *et al.*, 1971). Subseqüentemente, a atividade inibitória sobre o crescimento de plantas foi constatada para o plumierídeo (Tiwari *et al.*, 2002). A atividade antifúngica também foi evidenciada para o extrato metanólico das flores da *Allamanda cathartica*. O princípio ativo isolado foi denominado

allamandosídeo, porém sua estrutura química não foi elucidada (Tripathi *et al.*, 1977). Uma atividade algicida foi relatada para os iridóides cumarato de plumierídeo e glicosil cumarato de plumierídeo (Coppen *et al.*, 1983).

Entre os compostos isolados do gênero *Allamanda* vale salientar a alta atividade do iridóide fulvoplumierina contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV – 1) (Tan *et al.*, 1991), leucemia P – 388 e vários tipos de células de câncer humano (mama, colon, pulmão, melanoma) (Kardono *et al.*, 1990). Estudos com inibidores tumorais originados desta planta mostraram que o extrato etanólico das raízes possui uma significativa atividade *in vivo* contra células leucêmicas P-388 em ratos. Esta atividade é também visualizada *in vitro* contra células derivadas de carcinoma humano nasofaríngeo. A estrutura do composto ativo foi elucidada, sendo um iridóide lipofílico denominado allamandina (Kupchan *et al.*, 1974).

Os iridóides são substâncias monoterpênicas sintetizadas no reino vegetal, por meio de uma ciclização alternativa do pirofosfato de geranila (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001). Neste importante e complexo grupo de metabólitos secundários, encontra-se o iridóide plumierídeo (Figura 2).

Recentemente, o composto iridóide plumierídeo demonstrou, em ratos, num tratamento oral diário (15 mg/rato/dia), durante 60 dias, uma significativa redução de peso do epidídimo, vesícula seminal e próstata ventral além de reduzir a produção de espermátide e reduzir a motilidade e densidade dos espermatozoides (Gupta *et al.*, 2004). Este composto também apresentou uma potente atividade antidermatofítica contra as espécies *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium gypseum*, apresentando alta toxicidade (Tiwari *et al.*, 2002).

A *Allamanda cathartica* também se destacou ao inibir a hemorragia causada pelo veneno do réptil *Bothrops atrox* (Otero *et al.*, 2000) e ao demonstrar uma potente atividade cicatrizante em ratos (Nayak *et al.*, 2006).

Desde a descoberta do iridóide antileucêmico allamandina, várias investigações foram realizadas para verificar a existência de outros iridóides com atividade biológica importante, obtendo grande resultados, como o isolado da espécie vegetal *Plumeria rubra*, que demonstrou atividade antibacteriana (Hamburger *et al.*, 1991). Destaca-se também a atividade antiinflamatória de iridóides isolados das espécies *Dunnia sinensis* e *Picrorhiza kurroa* (Qia *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2003) e anti-nociceptiva de iridóides isolados da espécie vegetal *Stachytarpheta cayennensis* (Schapoval *et al.*, 1998). Iridóides inibidores de TNF- $\alpha$  e da expressão das enzimas iNOs e COX<sub>2</sub> e de outras enzimas foram isolados da espécie vegetal *Patrinia saniculaefolia* e de mais 14 espécies vegetais encontradas na Malásia (Hye *et al.*, 2003; Sui-Kiong *et al.*, 2003).

O tratamento sub-cutâneo realizado com o extrato etanólico obtido a partir das raízes, caule, folhas e flores da *Allamanda cathartica* (300 - 1000 mg/kg, s.c), 20 min antes da injeção intraplantar de carragenina, no modelo de edema de pata em camundongos, resultou em uma eficiente ação anti-edematogênica, com uma atividade relativamente maior no extrato das flores, desde há primeira hora após a administração a instalação da resposta edematogênica (Bortolini *et al.*, 2001). Diante destes resultados o presente estudo busca investigar o possível envolvimento do composto plumierídeo com esta atividade anti-inflamatória presente nos extratos brutos.

## ***2.Objetivos***

---

---

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se o composto iridóide Plumierídeo, obtido da espécie vegetal *Allamanda cathartica*, apresenta efeito antiinflamatório e/ou antinociceptivo em alguns modelos experimentais. Além disso, também constituiu objetivo do presente estudo investigar, com auxílio de técnicas farmacológicas e de dosagens bioquímicas, alguns dos mecanismos que poderiam estar correlacionados às ações antinociceptivas e/ou antiinflamatórias deste composto.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a influência da administração subcutânea do plumierídeo sobre as respostas edematogênicas inflamatórias induzidas pela injeção intraplantar de diferentes agentes flogísticos na pata de camundongos, bem como o decurso temporal destes efeitos;
- Verificar a possível biodisponibilidade do plumierídeo, quando administrado por via oral, em ratos e camundongos, submetidos à inflamação aguda, no modelo de edema de pata induzido por carragenina, bem como seu possível envolvimento com a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase neste processo;
- Investigar a influência da administração tópica ou oral do plumierídeo sobre a resposta inflamatória no modelo de edema de orelha induzido pela administração tópica ou intra-dérmica de diferentes agentes flogísticos;

- Caracterizar o possível efeito do plumierídeo sobre a migração celular presente no decorrer do processo inflamatório, no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos;
- Avaliar se o plumierídeo apresenta atividade antinociceptiva no teste de formalina em camundongos, bem como o decurso temporal deste efeito;
- Analisar a influência da administração oral do plumierídeo sobre as respostas inflamatória e hiperalgésica crônicas induzidas pela injeção intraplantar de CFA (Adjuvante completo de Freund), na pata de camundongos e hiperalgesia mecânica, bem como o decurso temporal destes efeitos;
- Verificar a influência da administração oral do plumierídeo na hiperalgesia térmica e alodinia mecânica associada a um modelo de dor neuropática em ratos, bem como o decurso temporal destes efeitos.

### ***3. Materiais e Métodos***

---

---

### **3.1. Materiais**

#### **3.1.1. Animais**

Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss machos (pesando entre 25 e 30 g) e ratos Wistar machos (pesando entre 300 e 350 g), criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Depois do período de desmame, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, onde foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura ( $23 \pm 2$  °C), umidade (60 a 80%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 hs; luz ligada às 06:00 hs) controladas, com livre acesso a água e ração especial para roedores.

Os animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização de quaisquer procedimentos experimentais, os quais foram sempre realizados entre 08:00 e 17:00 hs.

Todos os experimentos realizados no presente trabalho foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo de nº 23080.034723/2005-88/UFSC e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes proposta pela “International Association for Study of Pain” (IASP) (Zimmermann, 1983).

#### **3.1.2. Isolamento e Identificação Química do Composto Plumierídeo**

*Allamanda cathartica* L. (Apocinaceae) foi coletada em Blumenau, no estado de Santa Catarina, Brasil. Uma exsicata encontra-se catalogada no Herbário Miguel Klein, localizado na Universidade Regional de Blumenau,

Brasil, sob o número de registro H-5. Após a coleta, as partes da planta foram separadas e secas à temperatura ambiente protegido da luz solar. Quando totalmente secas, foram devidamente pesadas e trituradas separadamente, com etanol a 95% e maceradas em recipientes escuros, sob temperatura ambiente por um período de dez dias. Após a maceração os extratos foram concentrados a pressão reduzida em evaporador rotativo, sob temperatura de aproximadamente 40°C para eliminação do solvente.

Para obtenção do composto plumierídeo, os extratos obtidos dos caules, folhas e flores foram reunidos (66 g) e o conjunto submetido a uma separação preliminar em coluna cromatográfica utilizando-se hexano, clorofórmio e etanol. A fração de clorofórmio:etanol 1:1 (15,2 g) foi recromatografada em coluna de sílica gel, eluindo-se com misturas de clorofórmio e etanol em ordem crescente de polaridade. O processo de separação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. A fração clorofórmio/etanol 7:3 forneceu o plumierídeo (2,6 g) (Malheiros *et al.*, 1997), o qual foi submetido à ressonância magnética nuclear, a fim de comprovar sua estrutura.

### **3.1.3. Drogas e Soluções**

Para realização deste estudo, foram utilizadas as seguintes drogas: carragenina, dextrana, zimosano, captopril, prostaglandina E<sub>2</sub>, adjuvante completo de Freund (CFA), serotonina, histamina, naproxeno, óleo de cróton, tetrametilbenzida (TMB), ácido etileno diaminotetraacético (EDTA), brometo de hexadecil-trimetilamônio (HTAB) e substância P, provenientes da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA); C5a (65-74) e fator de ativação plaquetária (PAF), obtidos da Bachem Bioscience (King of Prússia, PA, EUA); cloridrato de

morfina, proveniente da Merck; xilazina (Dopaser<sup>®</sup>), proveniente da Calier S.A. (Barcelona, Espanha); cetamina (Dopalen<sup>®</sup>), proveniente da Vetbrands (Jacareí, SP); Cloridrato deoxitetraciclina (Terramicina<sup>®</sup>), obtido do Laboratório Pfizer (Guarulhos, SP, Brasil), ácido araquidônico, obtido da Cayman; bradicinina, proveniente da Neo MPS (Strasbourg; França); dexametasona (Decadronal<sup>®</sup>), obtida da Prodome (São Paulo, SP, Brasil) e formalina obtida a partir da diluição de formaldeído, proveniente da Nuclear (Saõ Paulo, SP, Brasil).

As soluções estoque de prostaglandina E<sub>2</sub> e histamina (10<sup>-2</sup> M), serotonina, substância P, bradicinina e C5a (10<sup>-3</sup> M) foram preparadas em solução salina tamponada com fosfato (phosphate-buffered saline – PBS) e mantidas a –18° C em alíquotas de 100 a 200 µl. As soluções estoque de PAF (10<sup>-3</sup> M) foram preparadas com albumina de soro bovina (BSA 1%) e também armazenadas a –18° C, em alíquotas de 50 µl. Todas as soluções estoque foram diluídas para a concentração desejada, em PBS, imediatamente antes do uso.

### **3.2. Procedimentos Experimentais**

#### **3.2.1. Modelos Experimentais de Inflamação**

##### **3.2.1.1. Edema de Pata**

Os experimentos de edema de pata foram realizados conforme descrito por Winter e colaboradores (1962), com pequenas modificações, em camundongos ou em ratos. Os camundongos receberam, por via intraplantar e na pata direita, injeção de 25 µl de salina contendo, carragenina (300 µg/pata), dextrana (300 µg/pata), zimosano (500 µg/pata) ou formalina (2,5%). A pata esquerda recebeu o mesmo volume de salina e foi utilizada como controle. O aumento do volume da pata foi medido por pletismometria (Pletismômetro, Ugo Basile, Milão, Itália), de acordo com a técnica descrita por Ferreira *et al.* (1978) e modificada para camundongos por Henriques *et al.* (1987). Essas medidas foram realizadas 60, 120, 240, 300 e 360 minutos após a injeção de carragenina, dextrana e zimosano, ou 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção de formalina. A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (em ml) e tomada como índice de edema. Já os ratos receberam, também por via intraplantar, na pata direita, 50 µl de salina contendo, carragenina (500 µg/pata). A pata esquerda recebeu o mesmo volume de salina e foi utilizada como controle. O aumento do volume da pata foi medido por pletismometria, como descrito anteriormente.

Grupos adicionais de camundongos tratados com injeção intra-plantar de carragenina ou salina e administração oral de plumierídeo (1µg/kg) ou subcutânea de dexametasona (0,5 mg/kg), foram utilizados para avaliação indireta

do acúmulo de neutrófilos na pata, através da medida da atividade da enzima mieloperoxidase. Seis horas após a injeção i.pl. de carragenina ou do veículo (salina), os camundongos foram sacrificados e a pele das suas patas foi removida. As amostras para a medida da atividade da MPO foram preparadas como descrito por De Young *et al.* (1989). Os tecidos foram homogeneizados em 0,5 ml de tampão fosfato (80 mM, pH de 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado 12000 g, por 15 min, a 4 °C. Trinta  $\mu$ l de sobrenadante das amostras foram pipetados em uma microplaca de 96 poços. Para o ensaio, 200  $\mu$ l de uma solução contendo 100  $\mu$ l PBS (80 mM, pH 5,4), 85  $\mu$ l de PBS (0,22 M, pH 5,4) e 15  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio (0,017%) foram adicionados em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu$ l de tetrametilbenzidina (18,4 mM, em 8% de dimetilformamida). A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi terminada pela adição de 30  $\mu$ l de acetado de sódio (1,46 M, pH 3,0). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente e expressa como densidade ótica por miligrama de tecido (DO/mg), sendo utilizado um leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.) com filtro de 630 nm. Os experimentos foram realizados 2 vezes em duplicatas.

### **3.2.1.2. Edema de pata persistente induzido por CFA**

O edema persistente causado pela injeção i.pl. de 20  $\mu$ l de solução com o Adjuvante completo de Freund (CFA), na pata direita de camundongos, foi utilizado para avaliar o possível efeito anti-edematogênico persistente do composto plumierídeo.

O edema de pata induzido pelo CFA foi medido inicialmente 1 h após a indução do mesmo. As medidas foram feitas 1 vez ao dia (aproximadamente às 16:00 h), até o 21º dia após a aplicação de CFA. O tratamento seguiu dois protocolos distintos. O primeiro consistiu na administração prévia de plumierídeo (1 µg/kg, via oral, 30 min antes da injeção de CFA), seguida de injeções diárias iguais à primeira até o 5º dia após o CFA, sendo este tratamento repetido do 17º ao 21º dias. O segundo esquema de tratamento consistiu na administração de plumierídeo (1 µg/kg, via oral), por três vezes, no 1º, 5º e 17º dias após a injeção de CFA. A mensuração do edema se deu de forma semelhante àquela descrita anteriormente.

### **3.2.1.3. Edema de Orelha**

O protocolo experimental utilizado seguiu basicamente aquele proposto por Carlson (1985), com pequenas modificações. O edema de orelha foi induzido pela administração tópica de 20 µl de ácido araquidônico (AA; 2 mg/orelha) ou óleo de cróton (OC; 2,5%) ou ainda prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; 30 nmol/orelha) na superfície interna da orelha direita de camundongos. Os camundongos foram pré-tratados, 30 min antes, com 20 µl de dexametasona (0,2 mg/orelha), naproxeno (1 mg/orelha), plumierídeo (0,01; 0,1; 1 e 10 µg/orelha) ou veículo (acetona) por administração tópica na superfície externa da mesma orelha.

Grupos distintos de camundongos foram tratados, por via oral, com plumierídeo (1 µg/kg; 30 min) ou veículo e o edema de orelha foi induzido, 30 min depois, pela injeção intra-dérmica de bradicinina (3 nmol/orelha), histamina (200 nmol/orelha), substância P (30 nmol/orelha), serotonina (10 nmol/orelha),

anafilotoxina C5a (componente da cascata de complemento) (50 nmol/orelha), fator de agregação plaquetária (PAF) (10 nmol/orelha), carragenina (300 µg/orelha) ou ainda solução salina. As injeções foram aplicadas em um volume de 20 µl na superfície externa da orelha direita dos animais.

A medida da espessura das orelhas foi avaliada com o auxílio de um micrômetro (Fisher, USA) antes da aplicação do agente edematogênico (tempo zero - medida basal) e 1 h após AA, 6 h após óleo de cróton, ou 45 min após a prostaglandina E<sub>2</sub>. No edema induzido pela injeção intra-dérmica, a medida da espessura se deu da mesma maneira, nos tempos zero e 30 min após a indução com os diferentes agentes flogísticos utilizados. As diferenças entre a espessura basal da orelha e aquela observada ao final do período correspondente (em µm) foi utilizada como índice de edema.

#### **3.2.1.4. Pleurisia**

A pleurisia foi realizada como descrito previamente por Spector (1956) e modificada para camundongos por Henriques *et al.* (1990).

Camundongos foram tratados por via sub-cutânea com o composto plumierídeo (0,1; 0,3; 1 e 10 µg/kg) ou com dexametasona (0,5 mg/kg), trinta minutos depois, administrou-se carragenina (300 µg/cavidade) por via intratorácica, no lado direito da cavidade pleural do camundongo, utilizando-se uma agulha adaptada. Outro grupo distinto de camundongos recebeu injeção intratorácica de salina estéril e foi utilizado como controle. Os animais foram sacrificados 4 h após a injeção de carragenina, e fixados em uma plataforma cirúrgica, onde se fez uma incisão na pele do abdômen a fim de expor o apêndice xifóide, que foi pinçado para permitir realizar uma pequena incisão do

diafragma, permitindo a lavagem da cavidade pleural. Esta, por sua vez, foi lavada com 1,5 ml de PBS contendo heparina (5 UI/ml). O exudato foi cuidadosamente recolhido, quantificado e armazenado em tubos de eppendorff. Exudatos contaminados com sangue foram imediatamente desprezados (Salvemini *et al.*, 1996).

Para contagem total e diferencial dos leucócitos, uma alíquota do exudato foi diluída em solução de Turk (1/20). A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer por meio de microscópio óptico comum. Para contagem diferencial, foram preparadas lâminas, as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa e contadas através de microscópio óptico sob objetiva de imersão. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. da quantidade de leucócitos ( $\times 10^6$ ) contados e diferenciados.

### **3.2.2. Modelos Experimentais de Dor**

#### **3.2.2.1. Nociceção induzida por formalina**

O protocolo experimental utilizado para avaliar os efeitos nociceptivos induzidos pela injeção i.pl. de formalina seguiu, basicamente, aquele proposto originalmente por Dubuisson & Dennis (1977) e por Shibata e colaboradores (1989), com pequenas modificações. Este modelo experimental de nociceção declarada permite distinguir duas fases de resposta nociceptiva. A primeira fase, que é de origem neurogênica (i.e. decorrente da estimulação direta dos nociceptores), ocorre nos primeiros 10 min após injeção. Já a segunda fase, também chamada de fase inflamatória (pois depende da liberação de múltiplos mediadores inflamatórios), se manifesta somente a partir de 15 min após a injeção e estende-se até 60 min (para revisão ver Dubuisson & Dennis, 1997).

Camundongos foram tratados por via oral com o composto plumierídeo (100 µg/kg) ou por via intra peritoneal com cloridrato de morfina (10 mg/kg). Os camundongos do grupo controle receberam igual tratamento com o veículo (salina). Trinta minutos depois, cada animal recebeu uma injeção de formalina (2,5%) ou veículo (salina) na pata traseira direita. Imediatamente após a injeção, cada animal foi colocado, individualmente, sob um funil de vidro invertido, posicionado em uma plataforma elevada, atrás do qual foi apoiado um espelho (num ângulo de aproximadamente 70° em relação à bancada) para facilitar a visualização completa dos camundongos durante todo o período de observação. O tempo que cada animal despendeu lambendo a pata tratada foi registrado (em s), com auxílio de um cronômetro, em intervalos de 5 min, perfazendo um total de 30 min e então, considerado como índice de nocicepção.

Após este período de observação do comportamento nociceptivo, os animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub>. O tempo total de lambida registrado nos primeiros 10 min e dos 15 aos 30 min foi considerado indicativo da resposta nociceptiva de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> fases, respectivamente.

### ***3.2.2.2. Hipernocicepção mecânica induzida pelo CFA***

O modelo de hipernocicepção mecânica persistente causada pela injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA) foi utilizado para avaliar o possível efeito anti-alodínico do composto iridóide plumierídeo, utilizando-se o método do Von Frey manual.

Primeiramente, foi determinado o menor filamento capaz de causar 50% de resposta de retirada da pata. Para tal, os camundongos foram habituados diariamente ao aparato de experimentação (caixas de acrílico medindo 10 x 8 x 8 cm, sobre uma plataforma com piso de arame) durante 2 hs, nos 3 dias anteriores e no dia do teste comportamental. Em seguida, cada camundongo foi submetido a 10 estimulações com cada um dos filamentos de força crescente numa escala logarítmica (0,02 a 2 g; *Touch Test*, da North Coast Medical, Morgan Hill, CA, U.S.A.). Com os dados obtidos, construiu-se uma curva força-resposta que permitiu selecionar o filamento de 0,6 g como sendo o menor capaz de induzir a resposta dos animais em pelo menos 50% das estimulações. Em seguida, foram selecionados os camundongos que apresentavam limiar basal à estimulação mecânica em torno de 0,6 g. Para isso utilizou-se o método *Up and Down*, que consiste em apresentar, primeiramente, o filamento selecionado (no caso, 0,6 g). Se o camundongo responde ao estímulo, após um intervalo de pelo menos 2 seg, é apresentado o filamento imediatamente menor (0,4 g), caso o camundongo não responda, é apresentado o filamento imediatamente maior (1 g), e assim sucessivamente, até completar um total de seis estimulações. Os camundongos selecionados receberam injeção i.pl. de CFA (20 µl) ou salina e foram submetidos à estimulação mecânica, utilizando-se o método descrito acima. O tratamento com o plumierídeo (1 µg/kg), consistiu em uma única administração oral, nos dias 1º, 6º e 13º após a injeção intra-plantar de CFA.

### **3.2.2.3. Indução da Dor Neuropática - Constrição do nervo infraorbital**

A constrição do nervo infraorbital foi realizada com modificações ao método proposto originalmente por Vos *et al.* (1991). Os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, ip.) e foi realizada a tricotomia, bem como a assepsia da face com álcool iodado.

Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso, separadas aproximadamente por 2 mm. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras.

Os animais do grupo falso-operado foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constricto. Ao término da cirurgia os ratos foram tratados com antibiótico (cloridrato de deoxitetraclina, 60 mg/kg, i.m.) e mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia. Com o objetivo de verificar a eficácia do plumierídeo em inibir a hipernocicepção evocada por estímulos térmicos e ou mecânicos, realizamos os seguintes testes comportamentais:

**Estimulação mecânica** - Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os ratos foram habituados por pelos menos 2 horas nas caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma pré-seleção dos animais a qual consistiu na aplicação crescente de 10 filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA, 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 g) na região inervada pelo infraorbital, em ambos os lados da face. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas, em cada lado, com um intervalo de ~30 s entre cada aplicação. Considerou-se o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape. Apenas os animais que não apresentaram, na fase de pré-seleção, estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos subseqüentes, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta basal à estimulação mecânica superior a 10 g. Vinte dias após a cirurgia, o limiar de resposta ao estímulo mecânico foi novamente determinado (basal pós-cirurgia), em seguida os animais receberam os diferentes tratamentos, e foram repetidamente estimulados em intervalos de 30 min ou 1 h até no máximo 6 hs. O tratamento com o plumierídeo (1, 10 e 100 µg/kg) se deu 30 min antes da primeira estimulação, pós-cirurgia.

**Estimulação térmica por frio** - Para a realização deste teste os ratos foram previamente habituados nas caixas de observação por aproximadamente 30 min, e em seguida um spray de tetrafluoretano (Aerojet, Rio de Janeiro, Brasil) foi aplicado, por cerca de 1 s, na região inervada pelo nervo infraorbital (sobre

a área de inserção das vibrissas). Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (i.e. *grooming*) facial bilateral foi registrado durante 2 minutos. Foram incluídos nos experimentos apenas animais cujo tempo de *grooming* facial foi  $\leq 15$  s, antes da realização da constrição. Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção ao frio, a estimulação foi realizada, em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e 4 dias após a cirurgia, em intervalos de 30 min, perfazendo um total de 3 h. O tratamento com o plumierídeo (1 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se deu 30 min antes da primeira estimulação, pós-cirurgia.

***Estimulação térmica por calor*** - Neste teste, os ratos foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante ( $\sim 50^\circ$ ) foi posicionada aproximadamente a 1 cm da área de inserção das vibrissas. Em seguida, foi registrado o tempo de latência para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas. Foram incluídos nos experimentos apenas animais que apresentaram estas respostas entre 9 e 15 s a partir da aplicação do estímulo. Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção térmica a estimulação foi realizada, em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e em intervalos de 2 ou 4 dias, enquanto que para avaliação do efeito do tratamento, os animais foram estimulados, apenas no lado ipsilateral, no 4º dia após a cirurgia, em intervalos de 30 ou 60 min. O tratamento com o plumierídeo (1 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se deu 30 min antes da primeira estimulação, pós-cirurgia.

### **3.3. Análise Estatística**

Todos os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. dos valores absolutos. Os dados experimentais de edema de pata ou de orelha foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via, ou de medidas repetidas (para múltiplas comparações entre grupos ou entre valores dentro de cada grupo, em comparação com os valores basais), conforme mais pertinente, seguida do teste de Bonferroni ou do teste de Dunnet. Os dados dos experimentos de hipernocicepção mecânica foram avaliados através de ANOVA de Kruskal – Wallis seguida pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados referentes à hipernocicepção térmica foram analisados com ANOVA de medidas repetidas seguida de teste post-hoc de Newman-Keuls. Em todas as análises, valores de  $P > 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## ***4. Resultados***

---

---

#### 4.1. Influência do composto Plumierídeo nas respostas inflamatórias em diversos modelos experimentais

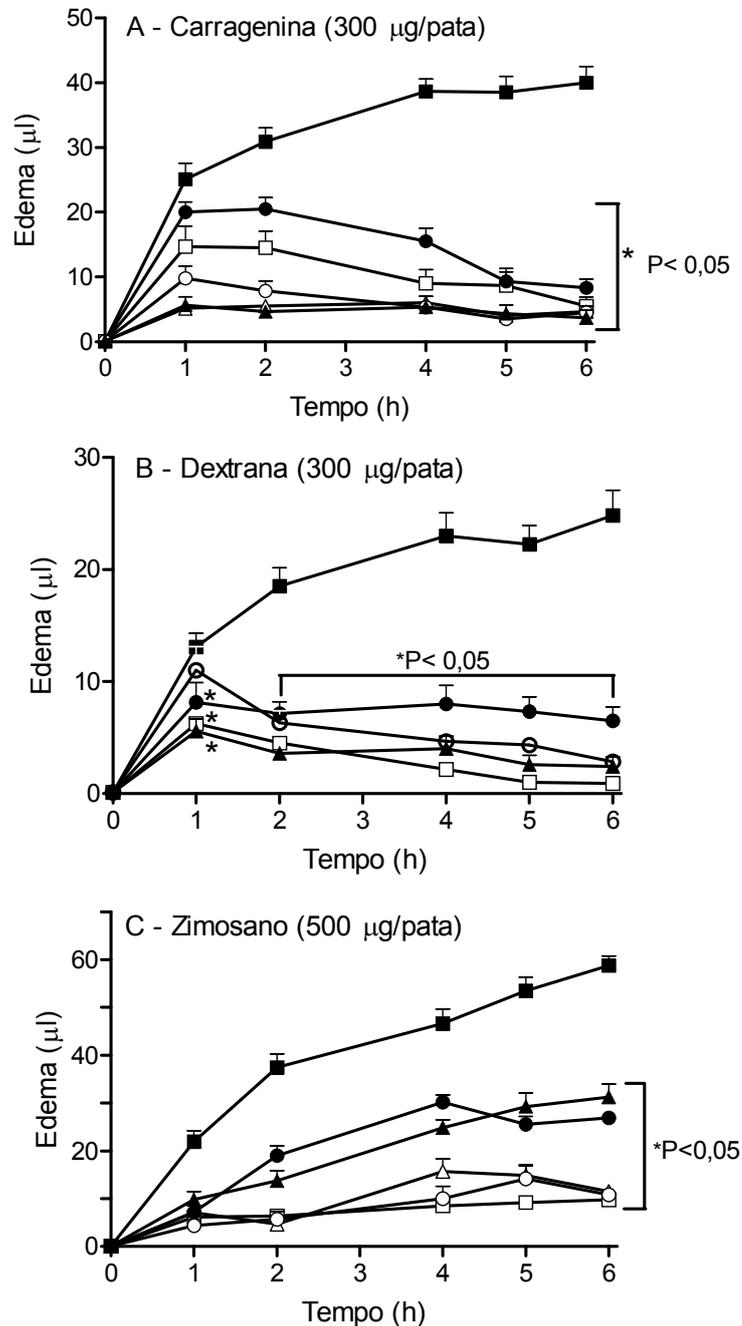
##### 4.1.1. Influência do tratamento sub-cutâneo ou oral com o plumierídeo sobre edema de pata induzido por diversos agentes flogísticos

As injeções i.pl. de Carragenina (300 µg/pata), dextrana (300 µg/pata), zimosano (500 µg/pata) ou formalina (2,5%, 25 µl/pata) produziram edema, aumentando significativamente o volume da pata, quando analisado até 6 h após a injeção i.pl.

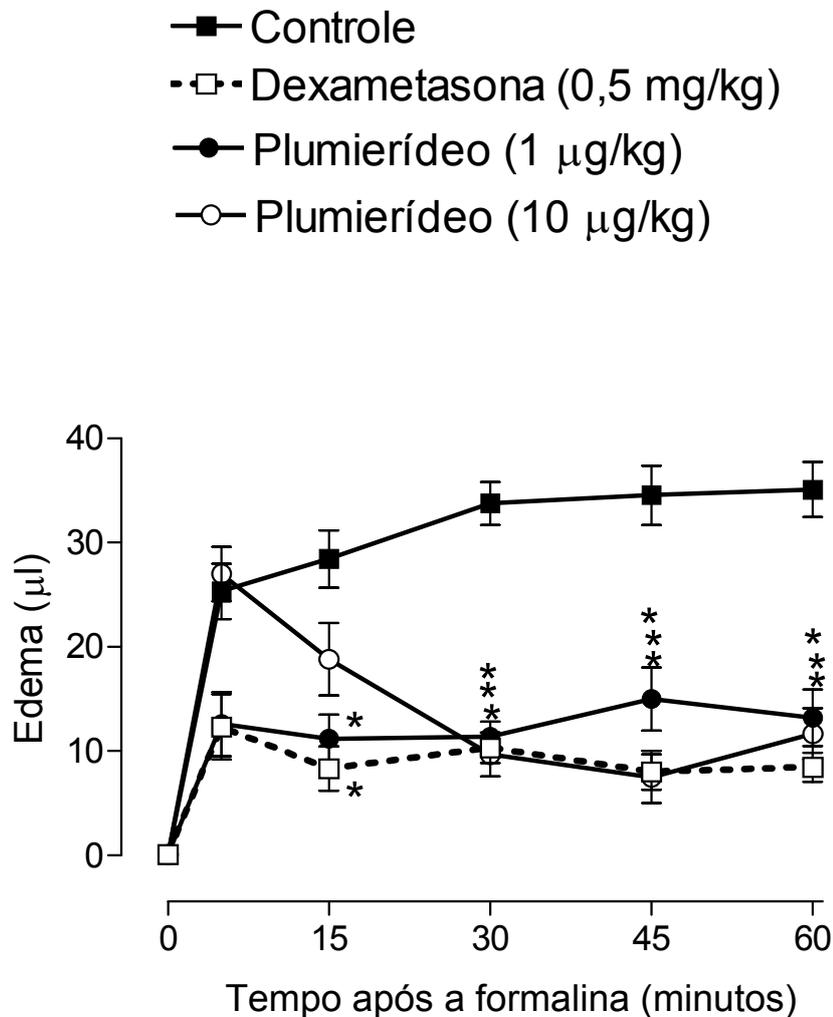
Os resultados da **Figura 3** demonstram que o tratamento sub-cutâneo com o plumierídeo (0,1; 1; 10 e 100 µg/kg) foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido pelas injeções i.pl. de carragenina **(A)**, dextrana **(B)** ou zimosano **(C)** desde a 1ª até a 6ª hora de avaliação, com uma ou mais doses testadas, de forma semelhante ao glicocorticóide dexametasona. Podemos destacar, entre as doses testadas, a de 10 µg/kg que, após 1 h da injeção i.pl. do agente flogístico inibiu o edema induzido por carragenina, dextrana e zimosano em 80, 71 e 67%, respectivamente.

A fim de demonstrar a capacidade do composto plumierídeo em inibir processos inflamatórios com características diferentes, realizamos ainda o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de formalina (2,5%; 25 µl). Como pode ser observado na **Figura 4**, o plumierídeo (10 µg/kg, s.c.) causou 73% de inibição, aos 5 min após a injeção de formalina, semelhante ao glicocorticóide dexametasona.

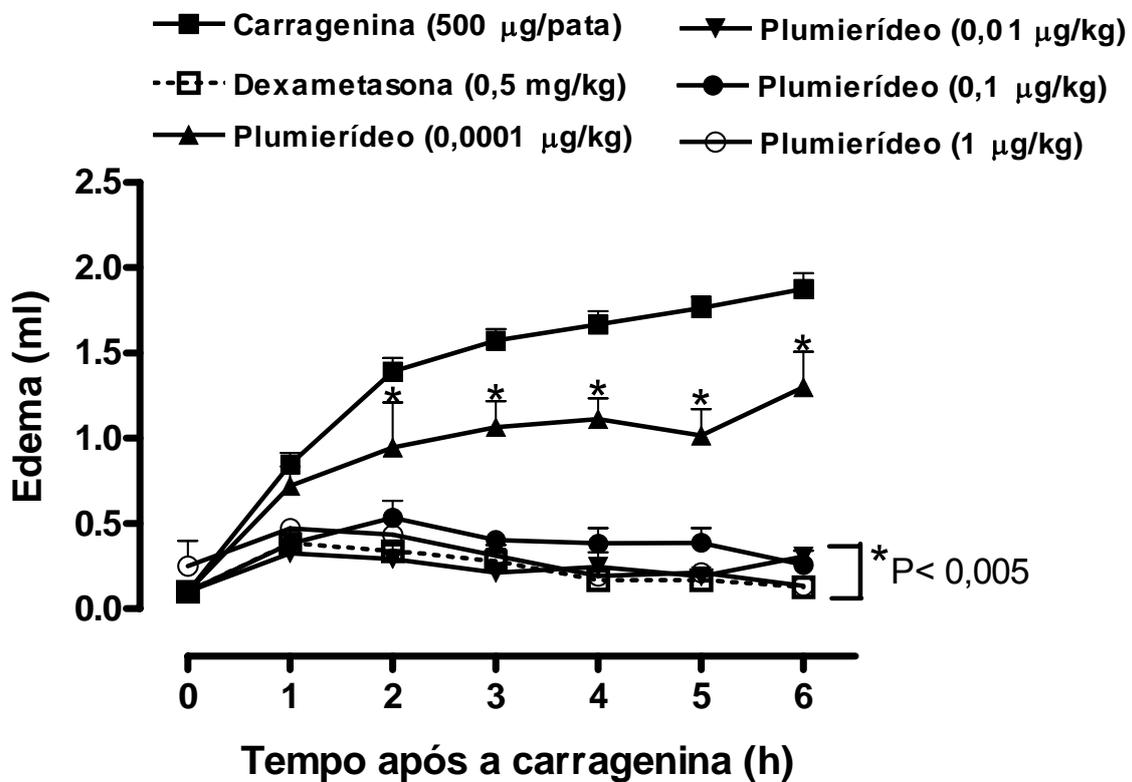
Visto que o plumierídeo foi eficaz em inibir o edema de pata em camundongos, resolveu-se confrontar estes resultados com experimentos realizados em outra espécie de roedor, ratos. Nesse sentido, o tratamento oral prévio com o plumierídeo também inibiu significativamente o edema induzido pela carragenina nesta espécie, com pico máximo de inibição na 4<sup>a</sup> hora de  $33,0 \pm 7$ ;  $8,0 \pm 5,0$ ;  $7,0 \pm 5,0$  e  $88,0 \pm 1,7$  %, com as doses de 0,0001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (**Figura 5**). A eficácia do plumierídeo em inibir o edema de pata por carragenina em rato foi semelhante àquela verificada após tratamento com o glicocorticóide dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.).



**Figura 3: Influência do tratamento sub-cutâneo com plumierídeo sobre o edema de pata em camundongos.** Os camundongos receberam tratamento por via sub-cutânea com o plumierídeo (0,1; 1; 10 e 100 µg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou salina, 30 min antes da injeção i.pl. de carragenina (A), dextrana (B) ou zimosano (C). Os valores representam média  $\pm$  E.P.M da diferença de volume entre a pata esquerda e a direita de 6-7 animais (por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.



**Figura 4: Influência do tratamento sub-cutâneo com o plumierídeo sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de formalina, em camundongos.** Os animais receberam tratamento por via sub-cutânea com o plumierídeo (1 e 10 µg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou salina, 30 min antes da injeção i.pl. de formalina. Os valores representam a média ± E.P.M da diferença entre os volumes da pata esquerda e a direita de 6-7 animais (por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.

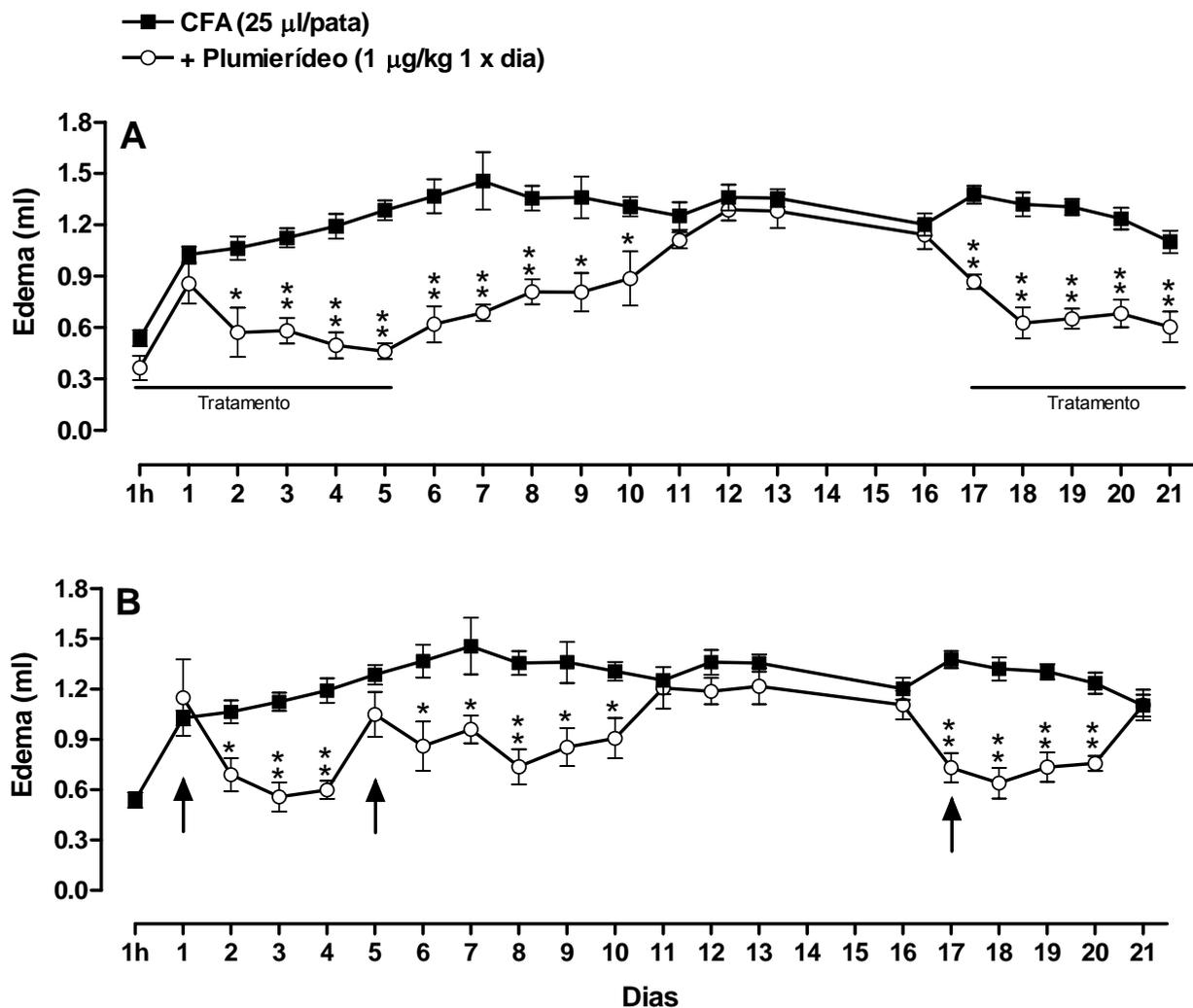


**Figura 5: Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de carragenina em ratos.** Os ratos receberam tratamento por via oral com o plumierídeo (0,0001; 0,01; 0,1 e 1 µg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou salina, 30 min antes da injeção i.pl. de carragenina. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da diferença de volume entre a pata esquerda e a direita de 6-7 animais (por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.

#### **4.1.2. Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de pata persistente induzido por CFA.**

Uma única injeção i.pl. de CFA foi capaz de causar aumento persistente do volume da pata de camundongos (**Figura 6**). Aumentos significativos foram observados a partir do 1º dia após a aplicação de CFA e o efeito persistiu por pelo menos 21 dias.

O plumierídeo foi capaz de inibir significativamente o edema de pata induzido por CFA, nos dois esquemas de tratamento realizados: pré ou pós-tratamento. Quando administrado por via oral, 30 min antes da injeção i.pl. de CFA e depois, diariamente, até o 5º dia (pré-tratamento), o composto plumierídeo (1 µg/kg) foi capaz de reduzir o edema de pata do 2º ao 10º dia de experimento. O composto plumierídeo, portanto, após sua última administração (5º dia), apresentou um efeito duradouro até o 10º dia. Ao repetir-se o tratamento do 17º ao 21º dia, esta resposta voltou a aparecer, em mesma intensidade (**Figura 6 A**). Quando administrado também por via oral, na mesma dose, agora 24 h após a injeção de CFA, ou seja, após a instalação da resposta inflamatória, o composto plumierídeo, em uma única dose acarretou inibição do edema do 2º ao 4º dia de experimento. De modo semelhante, novas administrações de plumierídeo no 5º e no 17º dias provocaram efeitos antiedematogênicos do 6º ao 10º dia e do 17º ao 20º dias, respectivamente (**Figura 6 B**).



**Figura 6: Influência do tratamento oral com o composto plumierídeo sobre o edema de pata persistente induzido pela injeção i.pl. de CFA.** Os animais receberam tratamento (A) por via oral com o composto iridóide plumierídeo (1  $\mu$ g/kg) ou salina, 30 min antes da injeção i.pl. de CFA, e depois diariamente até o 5<sup>o</sup> dia. Este esquema foi repetido no 17<sup>o</sup> dia, mostrando-se efetiva em inibir o edema da pata. Em um grupo distinto, os animais receberam um pós-tratamento (B), sendo o composto plumierídeo administrado 24 h, 5 e 17 dias após a injeção i.pl. de CFA. A aumento do volume da pata foi medido diariamente com auxílio do pletismômetro. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da diferença de volume entre a pata direita e a esquerda (n= 6-7 animais por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de Mann-Whitney, adotando  $P^* < 0,05$  e  $P^{**} < 0,01$ .

---

---

#### **4.1.3. Influência do tratamento tópico ou oral com o composto plumierídeo sobre edema de orelha**

A administração tópica de óleo de cróton (2,5%/orelha; 20  $\mu$ l) induziu, 6 h após sua administração, um edema equivalente a  $451,3 \pm 26 \mu\text{m}$ , no grupo tratado apenas com a administração tópica do veículo (acetona) 30 minutos antes da indução do processo. O pré-tratamento tópico com o composto plumierídeo nas doses de 0,01; 0,1; 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{orelha}$  foi capaz de reduzir significativamente o edema no intervalo avaliado para  $257,3 \pm 47,5$ ;  $162 \pm 32,5$ ;  $150,33 \pm 29,5$  e  $162,1 \pm 26,6 \mu\text{m}$ , respectivamente. Quando o pré-tratamento foi realizado com o antiinflamatório dexametasona (0,2 mg/orelha), a inibição foi semelhante à obtida pelo composto, de  $451,3 \pm 26$  para  $283,3 \pm 38,1 \mu\text{m}$  (**Figura 7**).

De forma semelhante, a administração tópica de ácido araquidônico (2 mg/orelha) induziu, 1h após sua administração, um edema equivalente a  $370,3 \pm 46,2 \mu\text{m}$ , no grupo tratado apenas com a administração tópica do veículo (acetona), 30 minutos antes da indução do processo inflamatório. O pré-tratamento tópico (30 min) com o composto plumierídeo nas doses de 0,01; 0,1e 1  $\mu\text{g}/\text{orelha}$  foi capaz de reduzir significativamente o edema avaliado para  $138,0 \pm 15,5$ ;  $177,8 \pm 14,4$  e  $239,3 \pm 24,8 \mu\text{m}$ , respectivamente. Comparativamente, a administração tópica de naproxeno (1 mg/orelha) foi capaz de inibir o edema para  $236,0 \pm 25,8 \mu\text{m}$  (**Figura 8**).

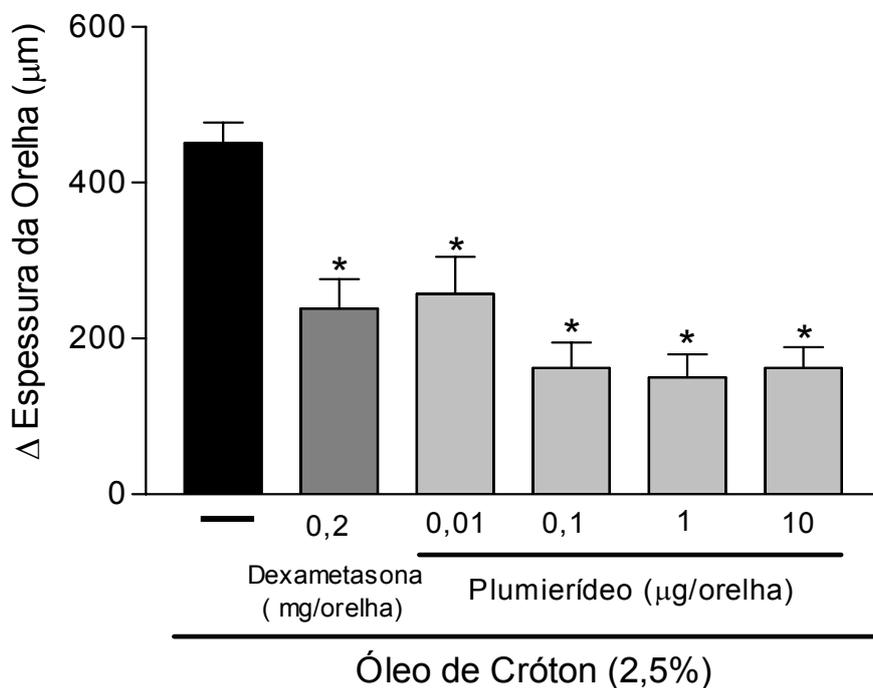
A fim de verificar por qual mecanismo o composto plumierídeo estaria causando a inibição do edema induzido pelo ácido araquidônico, decidiu-se por induzir esta resposta com a prostaglandina  $E_2$ , um derivado da cascata do ácido araquidônico originado pela via dependente da enzima COX.

A administração tópica com prostaglandina  $E_2$  (30 nmol/orelha), causou, após 45 minutos um edema de  $113,25 \pm 24,43 \mu\text{m}$ , no grupo tratado apenas com a administração tópica do veículo (acetona). O tratamento tópico com o composto plumierídeo nas doses de 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g/orelha}$ , foi capaz de reduzir significativamente o edema para  $20 \pm 5,8$ ;  $18,8 \pm 2,47$  e  $16,6 \pm 5,5 \mu\text{m}$  30 min após a injeção da prostaglandina  $E_2$  (**Figura 9**).

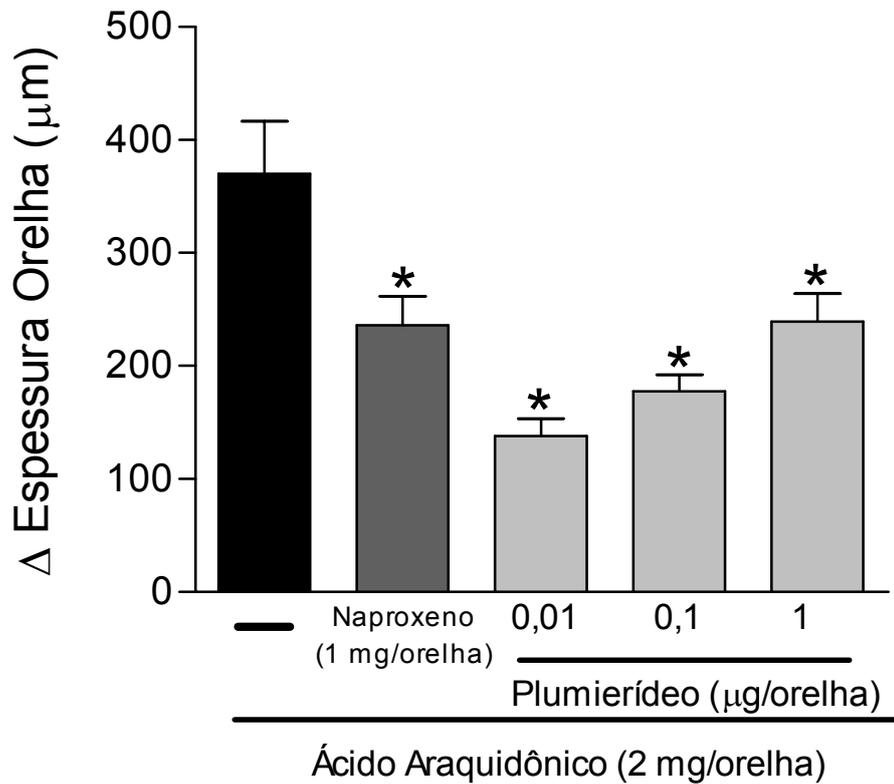
Com o propósito de tentar especificar um pouco mais o mecanismo antiinflamatório do plumierídeo, realizou-se experimentos para avaliar seu efeito sobre o edema causado por injeção intra-dérmica dos mediadores histamina (200 nmol/orelha), substância P (30 nmol/orelha), Serotonina (10 nmol/orelha), carragenina (300  $\mu\text{g/orelha}$ ), bradicinina (3 nmol/orelha), C5a (50 nmol/orelha) ou PAF (10 nmol/orelha). Todos os mediadores foram capazes de aumentar significativamente a espessura da orelha de camundongos, 30 min após sua administração (**Figuras 10 e 11**).

O tratamento oral de camundongos com plumierídeo (1  $\mu\text{g/kg}$ ) não foi capaz de prevenir o edema de orelha induzido por histamina ( $569,7 \pm 79,8 \mu\text{m}$ ) (**Figura 10 A**), substância P ( $976,0 \pm 86,3 \mu\text{m}$ ) (**Figura 10 B**), serotonina ( $1013,8 \pm 41,2 \mu\text{m}$ ) (**Figura 10 C**) ou PAF ( $762,2 \pm 49,8 \mu\text{m}$ ) (**Figura 10 D**), quando administrado 30 min antes da injeção intra-dérmica desses mediadores. Por outro lado, o mesmo tratamento reduziu significativamente a

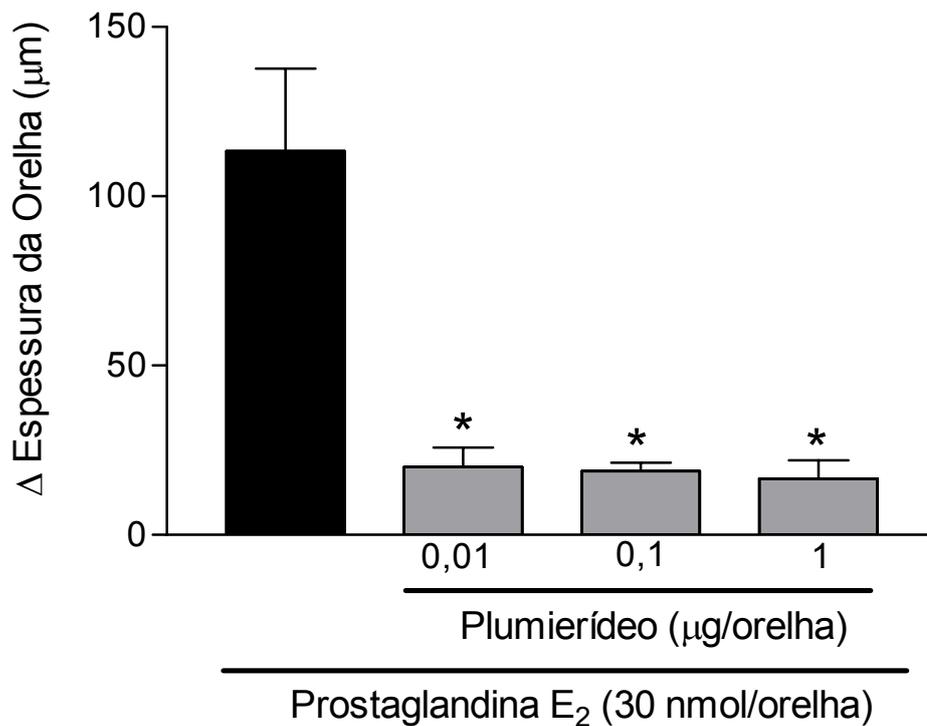
magnitude do edema de orelha causado pela injeção intra-dérmica de carragenina (de  $877,5 \pm 34,9$  para  $574,2 \pm 51,3 \mu\text{m}$ ) (**Figura 11 A**), bradicinina (de  $928,8 \pm 41,9$  para  $669,2 \pm 60,5 \mu\text{m}$ ) (**Figura 11 B**) ou de C5a (de  $508,4 \pm 54,2$  para  $268,6 \pm 49,5 \mu\text{m}$ ) (**Figura 11 C**).



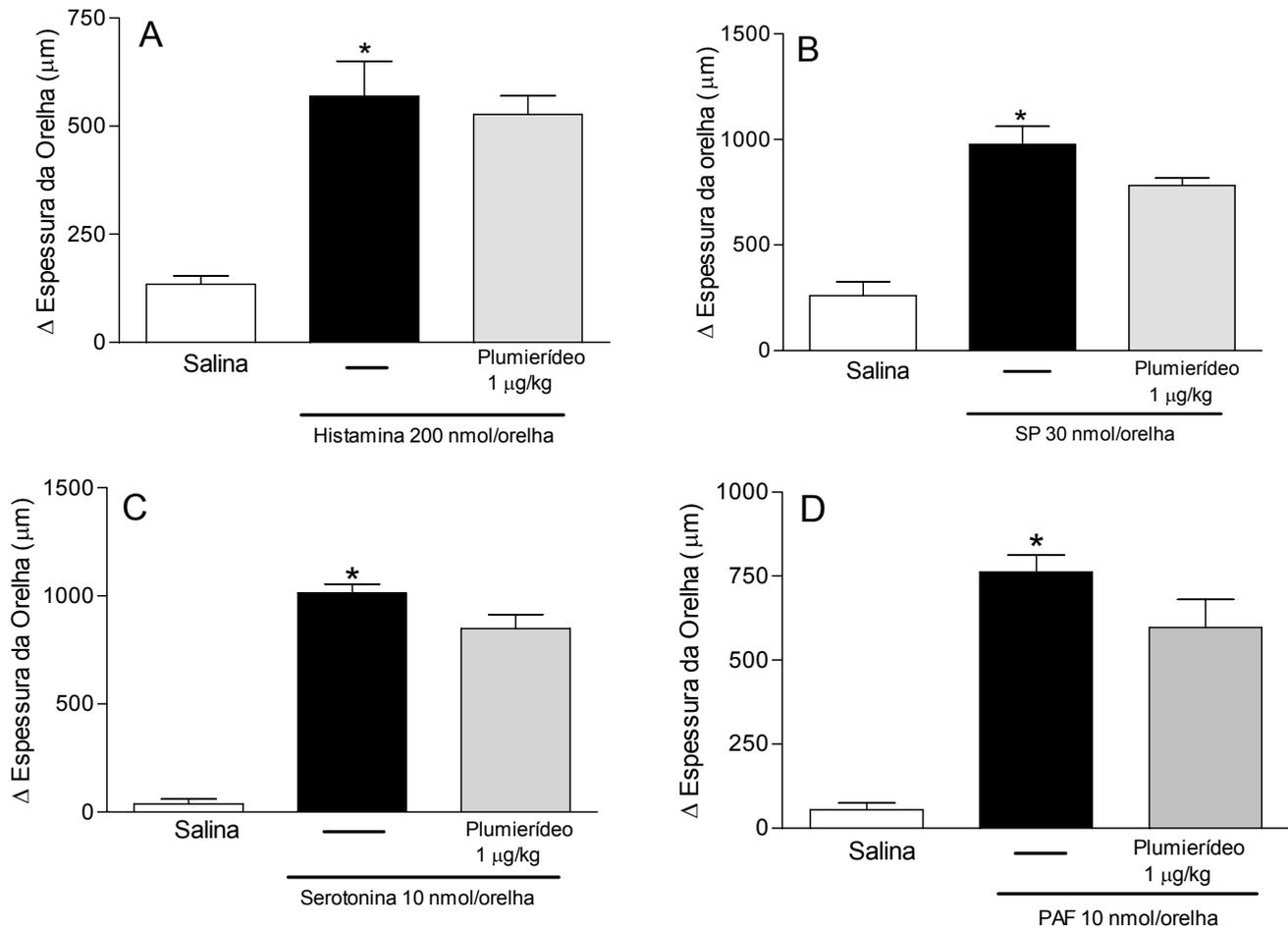
**Figura 7: Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de óleo de cróton.** Camundongos receberam tratamento tópico com plumierídeo (0,01; 0,1; 1 e 10  $\mu\text{g/orelha}$ ), dexametasona (0,2  $\text{mg/orelha}$ ) ou veículo 30 min antes do óleo de cróton. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da diferença entre as medidas do tempo zero e após a instalação da resposta inflamatória (5-6 animais por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.



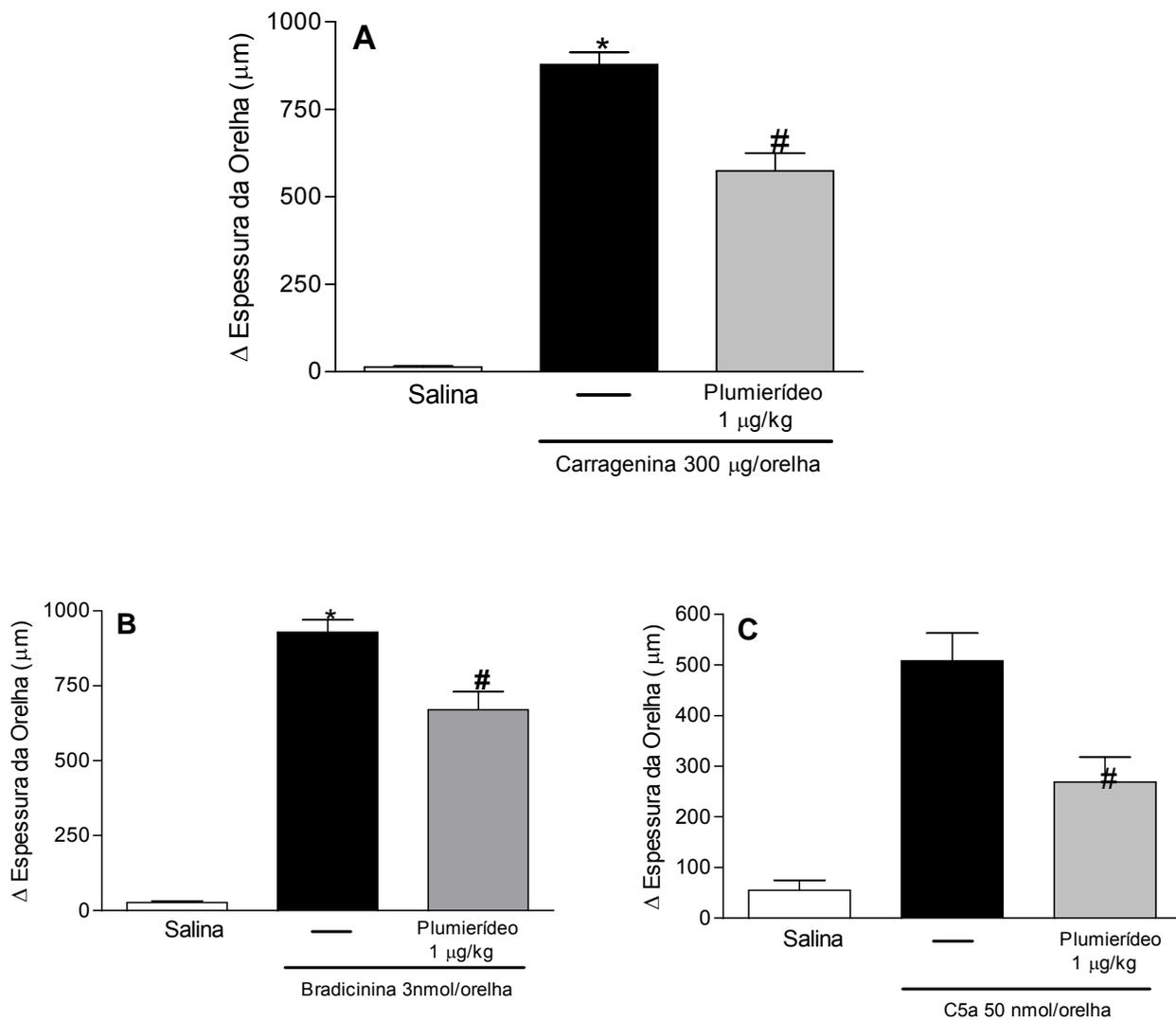
**Figura 8: Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de ácido araquidônico.** Camundongos receberam tratamento tópico com plumierídeo (0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g/orelha}$ ), naproxeno (1 mg/orelha) ou veículo 30 min antes do ácido araquidônico. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da diferença entre as medidas do tempo zero e após a instalação da resposta inflamatória (5-6 animais por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que



**Figura 9: Influência do tratamento tópico com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de prostaglandina E<sub>2</sub>.** Camundongos receberam tratamento tópico com o plumierídeo (0,01; 0,1; e 1 μg/orelha) ou veículo 30 min antes da prostaglandina E<sub>2</sub>. Os valores representam a média ± E.P.M da diferença entre as medidas do tempo zero e após a instalação da resposta inflamatória (5-6 animais por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam P < 0,05 para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.



**Figura 10: Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela injeção intra-dérmica de diversos mediadores inflamatórios.** Ratos receberam tratamento por via oral com o composto iridóide plumierídeo (1 μg/kg) ou salina, 30 min antes da injeção intra-dérmica de histamina (A), substância P (B), serotonina (C) ou PAF (D). Os valores representam a média ± E.P.M da diferença entre a medida realizada no tempo zero e 30 min após o estímulo inflamatório (n= 6-7 animais por grupo). A administração prévia do composto plumierídeo não foi capaz de prevenir o aumento do extravasamento plasmático. A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam a diferença estatística existente entre o grupo controle e o grupo salina (P<0,05).



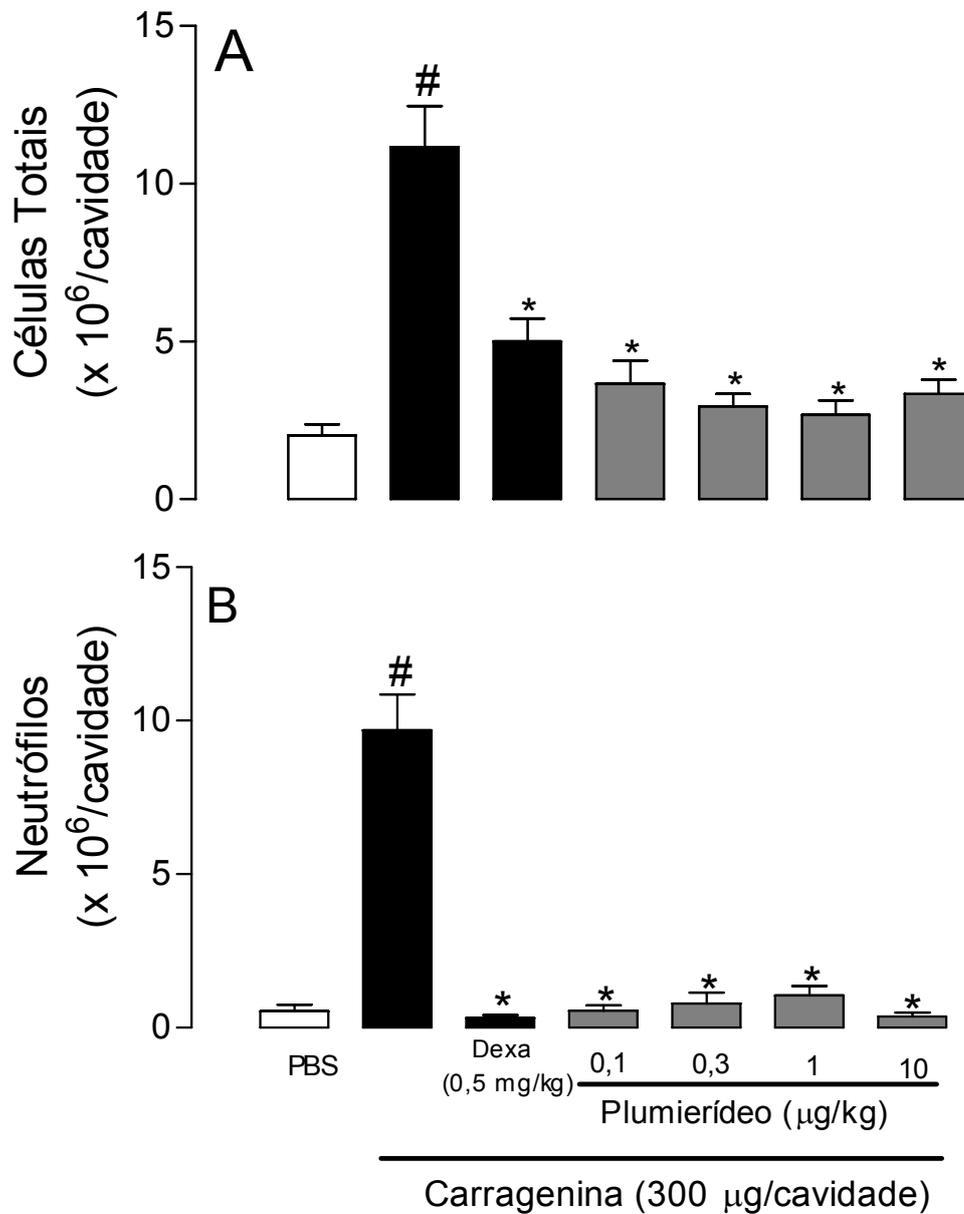
**Figura 11: Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o edema de orelha induzido pela injeção intra-dérmica de diversos mediadores inflamatórios.** Ratos receberam pré-tratamento por via oral com o composto iridóide plumierídeo (1 μg/kg) ou salina, 30 min. antes da injeção intra-dérmica de carragenina (A), bradicinina (B) ou C5a (C). Os valores apresentam média ± E.P.M de 5-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Cerquilhas denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle e asteriscos diferenciam grupo controle do grupo salina.

#### **4.1.4. Influência do tratamento com o composto plumierídeo sobre a migração celular presente no decorrer do processo inflamatório**

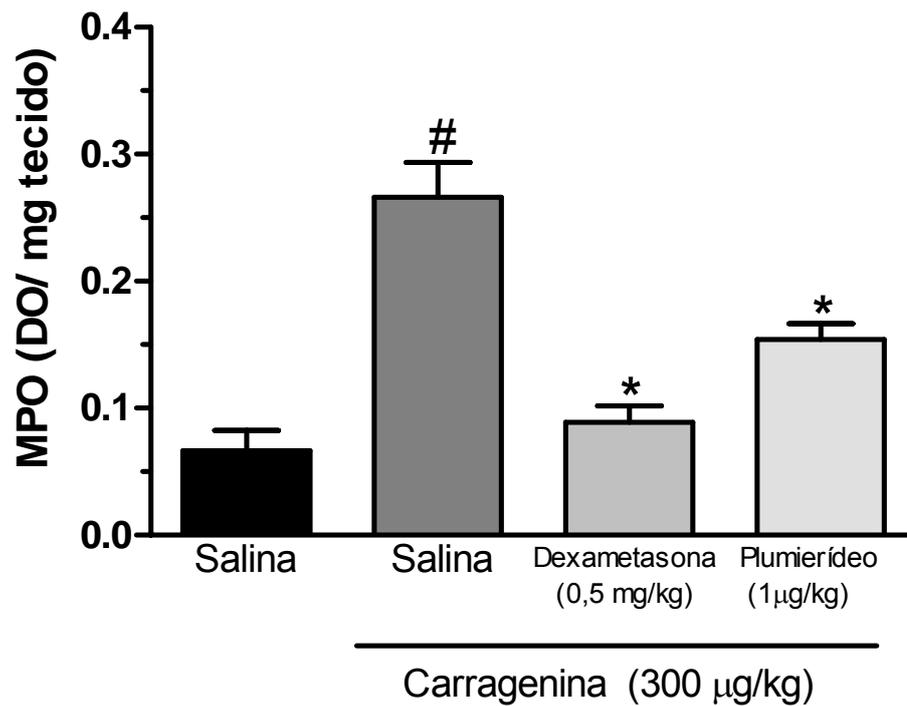
Para avaliarmos a influência do plumierídeo sobre a inibição da ativação de neutrófilos ou da migração destas células para o foco inflamatório, utilizamos o modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina e a dosagem bioquímica da atividade da enzima mieloperoxidase após o procedimento experimental de edema de pata induzido por carragenina.

No modelo de pleurisia, a injeção intratorácica de carragenina (300 µg/cavidade), na cavidade pleural de camundongos tratados com veículo, promoveu um acúmulo de  $11.160 \pm 1.3 \times 10^6$  leucócitos por cavidade, sendo que  $9.7 \pm 1.2 \times 10^6$  células corresponderam a neutrófilos. O tratamento com plumierídeo (nas doses de 0,1; 0,3; 1 e 10 µg/kg), 1 h antes da indução da resposta inflamatória, foi efetivo em inibir tanto o aumento da migração de leucócitos totais ( $3,66 \pm 0,75$ ;  $2,93 \pm 0,41$ ;  $2,68 \pm 0,45$  e  $3,35 \pm 0,45 \times 10^6$  cél./cav.) (**Figura 12 A**), quanto a migração de células polimorfonucleares (i.e. neutrófilos) em  $0,55 \pm 0,17$ ;  $0,78 \pm 0,36$ ;  $1,05 \pm 0,31$  e  $0,36 \pm 0,13 \times 10^6$  células para a cavidade, respectivamente (**Figura 12 B**). Os efeitos do plumierídeo foram similares aos obtidos com o tratamento prévio com o antiinflamatório dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.), que acarretou reduções do acúmulo de leucócitos totais (para  $5 \pm 0,73 \times 10^6$  células por cavidade), bem como de neutrófilos (para  $0,31 \pm 0,09 \times 10^6$  células por cavidade). Estes resultados nos indicam que o mecanismo da ação antiedematogênica do composto plumierídeo envolve, pelo menos em parte, a inibição da ativação de neutrófilos ou da migração destas células para o foco inflamatório.

A fim de verificar por qual destes mecanismos, o plumierídeo estaria agindo, realizamos o ensaio bioquímico para verificação da medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Camundongos que receberam injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) tiveram a atividade da MPO aumentada 6 h após sua administração ( $0,3 \pm 0,03$  DO/mg tecido). O tratamento prévio com dexametasona (0,5 mg/kg, 30 min. antes), reduziu significativamente a atividade da enzima da MPO ( $0,1 \pm 0,01$  DO/mg tecido). Da mesma forma, o tratamento oral dos animais com o composto plumierídeo (1 µg/kg, 30 min antes), inibiu significativamente a atividade da MPO ( $0,1 \pm 0,01$  DO/mg tecido) (**Figura 13**).



**Figura 12: Influência do tratamento sub-cutâneo com o composto plumierídeo sobre a pleurisia induzida por carragenina.** Os animais receberam tratamento sub-cutâneo com o composto iridóide plumierídeo (0,1; 0,3; 1 e 10 µg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo 1 h antes da injeção intratorácica de carragenina. Os valores representam a média ± E.P.M do total de leucócitos (**A**) e de neutrófilos (**B**) presentes na cavidade pleural de 8-10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle.

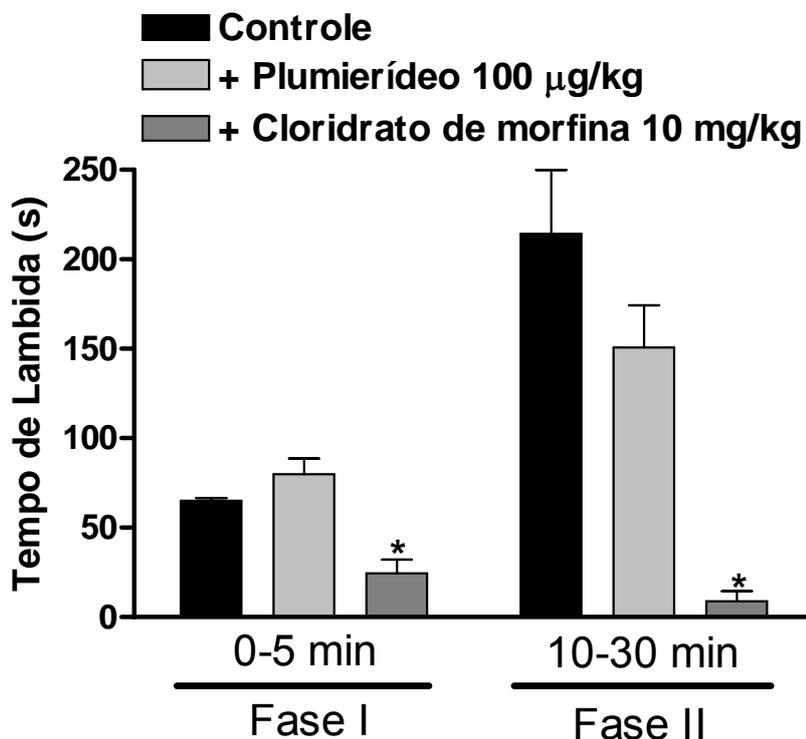


**Figura 13: Influência do tratamento oral com o plumierídeo sobre o aumento da atividade da MPO, em camundongos.** Os camundongos receberam tratamento oral com o plumierídeo (1 µg/kg), ou veículo, 30 min antes da injeção i.pl. de carragenina. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M de 5-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnet. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  para os tratamentos que diferenciam do grupo controle e a cerquilha indica diferença significativa com o grupo salina.

## 4.2. Influência do Plumierídeo na Nociceção

### 4.2.1. Influência do tratamento com o plumierídeo sobre a Nociceção Induzida por Formalina

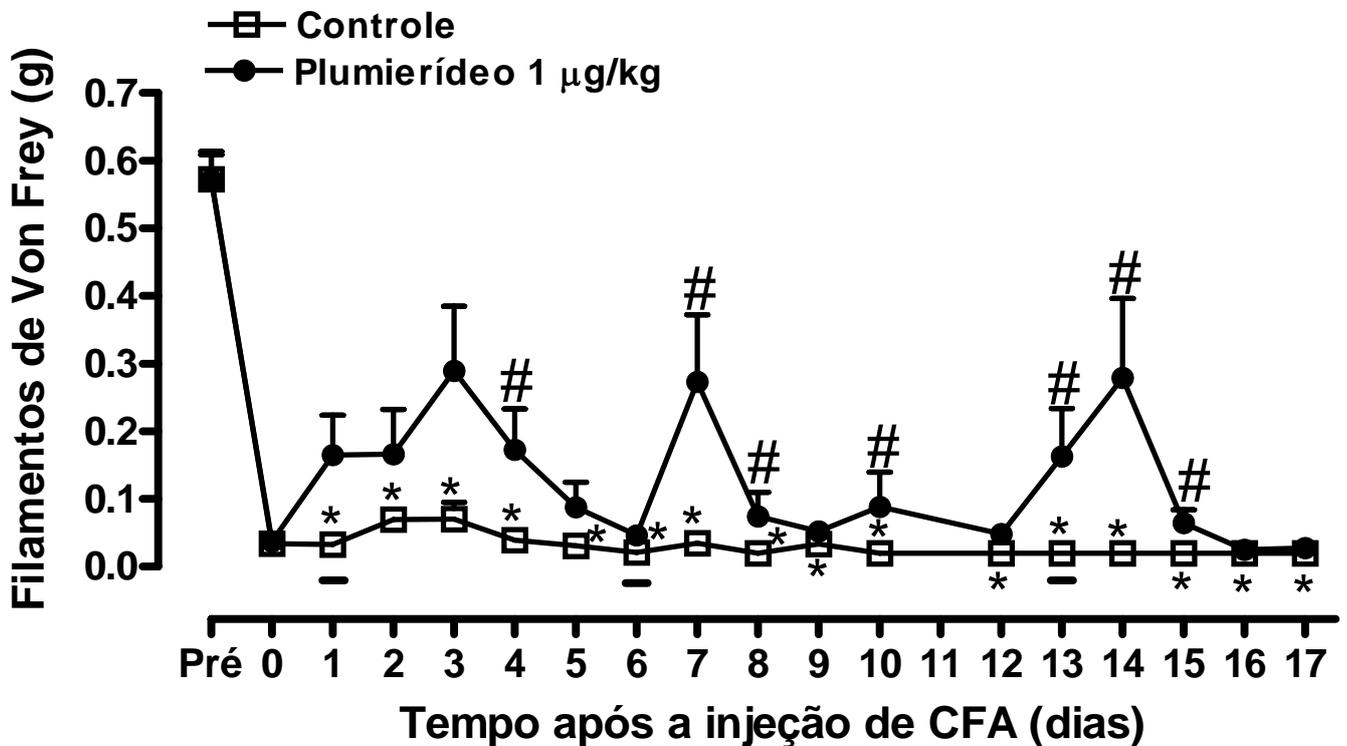
O tratamento sub-cutâneo com o composto plumierídeo (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), realizado 30 minutos antes da injeção de i.pl. de formalina (2,5%, 30  $\mu\text{l}$ ), não foi capaz de reduzir significativamente as respostas nociceptivas de camundongos, tanto as integrantes da primeira fase (fase neurogênica - 0 a 5 min), quanto à da segunda fase (fase inflamatória - 15 a 30 min). Ao contrário, tanto as respostas nociceptivas da primeira quanto da segunda fases induzidas pela formalina foram substancialmente inibidas pelo tratamento prévio com o analgésico opióide cloridrato de morfina (10 mg/kg, s.c.; **Figura 14**).



**Figura 14: Efeito do tratamento por via subcutânea com plumierídeo ou cloridrato de morfina sobre a primeira e a segunda fase da nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.** As respostas nociceptivas dos animais à injeção de formalina (2,5%, 25  $\mu\text{l}$ ) foram avaliadas durante as fases I (0-5 min) e II (10-30 min). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M de 5-7 animais. A análise estatística dos resultados foi realizada comparando todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

**4.2.2. Influência do tratamento com o composto plumierídeo sobre a hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)**

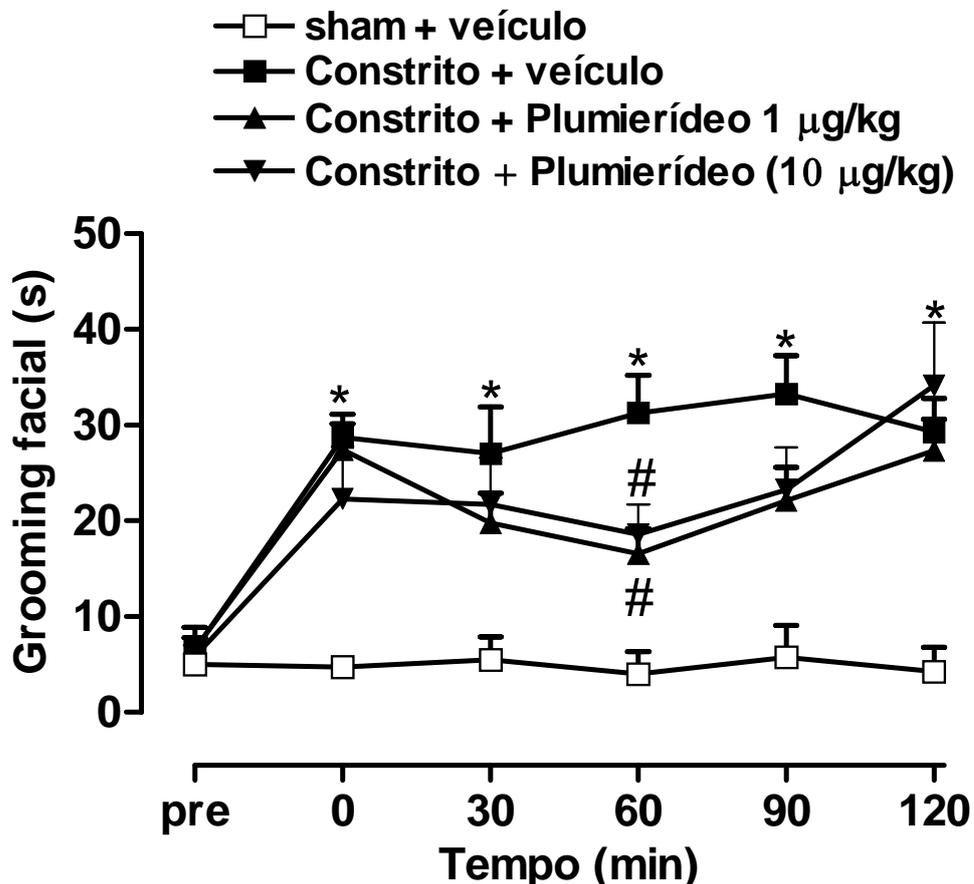
A injeção i.pl. de CFA foi capaz de induzir uma alodínia mecânica de longa duração em camundongos, caracterizada pela redução significativa do limiar de retirada da pata após estimulação mecânica com filamentos de Von Frey. A alodínia mecânica foi observada a partir do 1º dia após a injeção i.pl. de CFA e persistiu por pelo menos 17 dias. O tratamento com o plumierídeo (1 µg/kg), por via oral, foi realizado nos dias 1, 6 e 13 após a injeção intra-plantar de CFA, ou seja, após a instalação da alodinia mecânica. A primeira administração do plumierídeo (dia 1), apesar de aparentemente demonstrar uma inibição no 3º dia ( $0,09 > P > 0,05$ ), inibiu significativamente o limiar de retirada da pata apenas no 4º dia de experimento ( $P=0,007$ ). Por outro lado, os efeitos antialodínicos das administrações subseqüentes de plumierídeo (nos dias 6 e 13) foram mais persistentes, cada qual com duração de aproximadamente 3 a 4 dias (**Figura 15**).



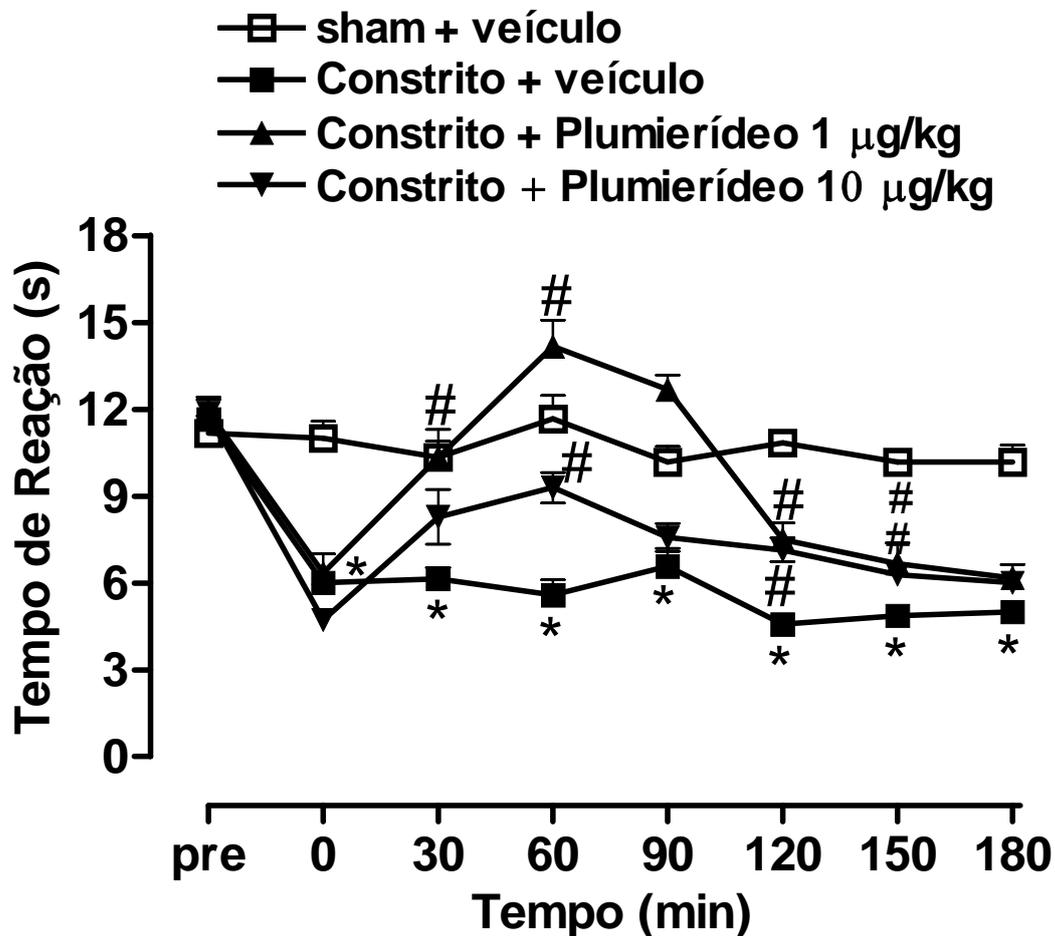
**Figura 15: Influência do tratamento oral com o composto plumierídeo sobre a alodinia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.** Os animais receberam tratamento por via oral com o plumierídeo (1 µg/kg) ou salina, nos dias 1, 6 e 13 após a injeção i.pl. de CFA. A estimulação mecânica foi realizada antes do início do experimento (pré) e diariamente com filamentos de Von Frey. Os valores apresentam média  $\pm$  E.P.M da força (em g) necessária para induzir o comportamento de retirada da pata do filamento (n= 6-7 animais por grupo). A análise estatística foi realizada com ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de Mann-Whitney. Asteriscos indicam diferenças significativas entre o grupo controle e a medida basal e as cerquilhas indicam diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado com o plumierídeo, adotando \*P< 0,05.

#### **4.2.3. Influência do tratamento com o Plumierídeo sobre a hipernocicepção mecânica e térmica no modelo de constrição do nervo infraorbital**

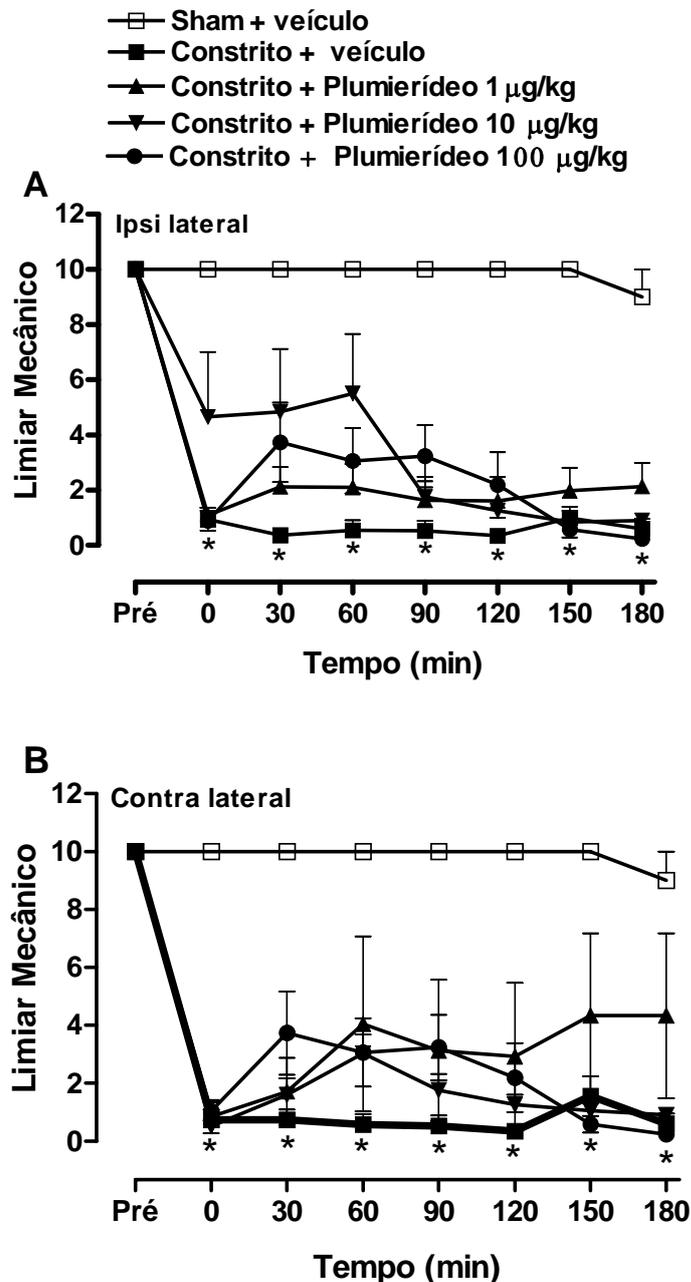
Ratos submetidos à constrição unilateral do nervo infraorbital apresentaram marcada hipernocicepção à aplicação de estímulos térmicos (frio ou calor) ou mecânicos na região das vibrissas ipsilaterais à cirurgia. Os efeitos do plumierídeo contra a hipernocicepção térmica e mecânica foram avaliados no 4<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias após a cirurgia, respectivamente. O tratamento oral dos animais com o composto iridóide plumierídeo, no 4<sup>o</sup> dia após a constrição do nervo infraorbital, foi capaz de reverter significativamente a hipernocicepção ao frio apenas na 1<sup>a</sup> hora após sua administração, de  $31 \pm 3,9$  s para  $16,5 \pm 2,6$  e  $18,5 \pm 3,2$  s, nas doses de 1 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Não foram observados efeitos antihipernociceptivos adicionais do composto contra estímulos aplicados a cada 30 min em outros momentos até 3 h após o tratamento (**Figura 16**). Por outro lado, como ilustra a **Figura 17**, o plumierídeo foi capaz de aumentar significativamente a latência para retirada da face do animal em resposta à aplicação de calor irradiante, nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 min após a administração da dose de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 60, 120 e 150 min após a dose de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (**Figura 17**). Ao contrário, a redução do limiar de resposta à estimulação mecânica observada em animais constritos 20 dias após a cirurgia não foi alterado significativamente pelo tratamento oral com o plumierídeo (1, 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), pelo menos no período de 3 horas após sua administração (**Figura 18**).



**Figura 16: Influência do tratamento oral com plumierídeo na hipernocicepção ao frio em ratos submetidos à constricção do nervo infraorbital.** Os animais receberam tratamento por via oral com plumierídeo (1 e 10 µg/kg) ou salina, 4 dias após a cirurgia. A figura ilustra as respostas dos animais à estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes do tratamento (tempo 0) e em intervalos de 30 min após o tratamento. Cada valor representa a média ± E.P. M do tempo que os animais despenderam executando *grooming* facial nos primeiros dois minutos após a aplicação do spray de tetrafluorano (n= 5-7 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor correspondente do grupo sham + veículo ou do grupo constricto + veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 17: Influência do tratamento oral com Plumierídeo na hipernocicepção ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital em ratos.** Os animais receberam tratamento por via oral com plumierídeo (1 e 10 µg/kg) ou salina, 4 dias após a cirurgia. A figura ilustra as respostas dos animais à estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes do tratamento (tempo 0) e em intervalos de 30 min após o tratamento. Cada valor apresenta a média ± E.P. M do tempo de reação ante a aplicação de calor (n= 5-7 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor correspondente do grupo sham + veículo ou do grupo constricto + veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 18: Influência do tratamento oral com plumierídeo na hipernocicepção mecânica em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital.** Os animais receberam tratamento por via oral com plumierídeo (1, 10 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou salina 20 dias após a cirurgia. A figura ilustra as respostas dos animais à estimulação mecânica antes da cirurgia (pré), antes do tratamento (tempo 0) e em intervalos de 30 min após o tratamento. Cada valor apresenta a média  $\pm$  E.P. M da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento nos lados ipsilateral ou contralateral à cirurgia ( $n = 8-10$  animais por grupo). Asteriscos denotam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao valor correspondente ao grupo sham + veículo. A análise estatística foi realizada com ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste U de Mann-Whitney.

## ***5.Discussão***

---

---

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o plumierídeo, um composto iridóide obtido a partir da *A. cathartica*, apresenta potente atividade antiinflamatória em diversos modelos experimentais de inflamação induzidos por diversos agentes flogísticos. Além disso, verificou-se que essa substância apresenta atividade analgésica em modelos de nocicepção inflamatória prolongada ou dor neuropática orofacial, bem como boa biodisponibilidade oral.

O possível potencial anti-inflamatório do composto plumierídeo foi primeiramente investigado em um modelo de edema de pata, contra a resposta inflamatória aguda induzida por carragenina (Winter *et al.*, 1962). Administrado tanto por via oral quanto sub-cutânea, o plumierídeo demonstrou ser um inibidor extremamente potente e eficaz da resposta edematogênica em camundongos. Os perfis semelhantes dos efeitos inibitórios do plumierídeo administrado por ambas as vias na dose de 0,1 µg/kg indicam que o composto apresenta excelente biodisponibilidade oral nesta espécie. Além disso, as propriedades antiedematogênicas do plumierídeo não se restringiram a esta espécie, pois a substância pareceu ser até mais potente em inibir o edema de pata causado por carragenina em ratos do que em camundongos. Em ambas as espécies a eficácia anti-edematogênica do plumierídeo foi similar àquela demonstrada pela dexametasona (0,5 mg/kg; s.c.), mas é surpreendente notar que a sua potência é muito maior que a exibida pelo glicocorticóide.

Na tentativa de elucidar melhor os possíveis mecanismos subjacentes à ação anti-edematogênica do plumierídeo, o mesmo foi testado ainda contra o edema de pata induzido por dextrana, zimosano e formalina. O conjunto de

mediadores e mecanismos inflamatórios mobilizados por cada um destes agentes flogísticos apresenta diferenças em comparação com os recrutados pela carragenina. Porém, a exemplo do que foi observado contra o efeito da carragenina, o plumierídeo foi igualmente eficaz em prevenir, marcadamente, o edema causado por cada um dos três agentes flogísticos. Ainda, a inibição proporcionada por 10 µg/kg de plumierídeo foi equivalente àquela induzida por 0,5 mg/kg de dexametasona tanto no modelo da dextrana quanto do zimosano. Contudo, diferentemente do componente edematogênico da resposta a formalina, tanto a primeira quanto a segunda fases da resposta nociceptiva declarada a este agente mostraram-se insensíveis à inibição pelo plumierídeo. Esta seletividade do plumierídeo em inibir o edema, mas não a dor, causada pela formalina favorece a hipótese de que o seu alvo de ação esteja implicado no mecanismo edematogênico, mas não nociceptivo. Este aspecto será ainda discutido mais detalhadamente abaixo.

Conforme visto no modelo de edema de pata, o plumierídeo também apresentou potente atividade anti-inflamatória contra o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos e por carragenina em ratos. Estes resultados indicam que as propriedades anti-inflamatórias do composto independem da região corporal inflamada por um agente flogístico.

Além dos eventos vasculares característicos de uma resposta inflamatória, como o aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo local e exudação plasmática, eventos celulares também são cruciais para manutenção desta resposta (Huere & Gounon, 1996). A fim de evidenciar uma possível influência do plumierídeo sobre tais eventos celulares

desencadeados durante a resposta inflamatória, testou-se sua capacidade em inibir a atividade da enzima mieloperoxidase, um “marcador” da infiltração de leucócitos para o sítio inflamatório (Posadas *et al.*, 2004). A exemplo da dexametasona, o plumierídeo causou potente inibição do aumento de atividade da MPO induzida na pata por injeção i.pl. de carragenina em camundongos. Esse resultado indica que o mecanismo de ação anti-edematogênica do plumierídeo envolve, pelo menos em parte, a inibição da ativação de neutrófilos ou da migração destas células para o foco inflamatório.

Com o intuito de investigar qual destes dois possíveis mecanismos celulares estaria envolvido nos efeitos do plumierídeo, o mesmo foi testado no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. A característica principal deste modelo é o influxo massivo de leucócitos, principalmente neutrófilos para o sítio da inflamação (Sedgwick & Lees, 1986). Além disso, encontram-se presentes no exudato pleural da cavidade desafiada com este agente, diversos mediadores responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório, tais como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxano (Horakova *et al.*, 1980; Harada *et al.*, 1982). O tratamento prévio com o composto plumierídeo foi capaz de praticamente abolir tanto o influxo de leucócitos totais, quanto o de neutrófilos, a exemplo da dexametasona. Esses resultados confirmam, portanto, que a inibição da migração de neutrófilos parece ser um componente importante da ação antiinflamatória do plumierídeo.

Além de exercer potente ação inibitória em modelos inflamatórios de fase aguda, o composto plumierídeo também mostrou-se bastante efetivo em

atenuar a intensidade da resposta inflamatória crônica induzida pela injeção i.pl. de CFA. Neste sentido, o tratamento oral com o composto plumierídeo (1 µg/kg), realizado de duas maneiras distintas (i.e. 5 administrações diárias consecutivas ou administrações isoladas nos dias 1, 5 e 17 após o CFA), reduziu marcadamente e de modo duradouro o edema ocasionado pela injeção i.pl. de CFA. Merece destaque especial o fato de que uma única administração de plumierídeo tenha promovido efeito antiedematogênico significativo que se estendeu por até 5 dias. Embora o plumierídeo não tenha influenciado a resposta nociceptiva à formalina, o composto reduziu a alodínia mecânica induzida pelo CFA de modo duradouro (por até 3-4 dias após uma única administração oral).

Cada um dos agentes flogísticos utilizados nos modelos discutidos até o momento induzem respostas inflamatórias mediadas por múltiplos mediadores e mecanismos. Neste contexto, para discernir os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória do composto plumierídeo, parece pertinente mencionar quais são os principais mediadores implicados nas respostas a cada agente. A resposta inflamatória induzida por carragenina na pata de camundongos é caracterizada por duas fases distintas. A primeira, que ocorre dentro das primeiras 24 h, é caracterizada pela presença predominante de neutrófilos e é mediada principalmente por histamina, serotonina, pelo aumento dos níveis de COX-2, o que leva a um aumento da síntese de prostaglandinas no foco inflamatório (Henriques *et al.*, 1987; Portanova *et al.*, 1996; Seibert *et al.*, 1994, 1997). A segunda fase (24-96 h) é sustentada principalmente pela liberação de prostaglandinas e é mediada também por bradicinina, leucotrienos e a

migração de células polimorfonucleares (Seibert *et al.*, 1994; Brito & Antônio, 1998; Ueno *et al.*, 2000). Em ratos, esta resposta inflamatória é mais curta mas também envolve duas fases. A primeira acontece nas primeiras duas horas e é sustentada pela liberação de histamina e serotonina, originados de mastócitos e aumento dos níveis de nitrato e nitrito ( $\text{NO}^3^-/\text{NO}^2^-$ ) e prostaglandina  $\text{E}_2$  no exudato da pata (Salvemini *et al.*, 1996). A segunda fase, que desenvolve-se entre 3-6 h após a carragenina (Kulkarni *et al.*, 1986; Brito & Antônio, 1998), é sustentada principalmente pela produção de citocinas, destacando-se a IL-1 $\beta$ , (por células residentes) bem como pela migração de neutrófilos (Vinegar *et al.*, 1969; DiRosa *et al.*, 1971; Wedmore & Williams, 1981; Ferreira *et al.*, 1981).

Por outro lado, o edema de pata causado por dextrana, um polissacarídeo de alto peso molecular, decorre de extravasamento plasmático induzido por ativação do sistema de cininas e liberação de histamina e serotonina originadas de mastócitos (Nishida *et al.*, 1979; Berstad, 1980; Lo *et al.*, 1981; Moodley *et al.*, 1982; Van Waave & Goosens, 1989; Gupta *et al.*, 2005). A resposta ainda está associada, pelo menos em ratos, com aumento dos níveis tissulares de  $\text{PGE}_2$  (Gulati *et al.*, 1983). Já o edema de pata induzido por zimosano, um componente do levedo *Saccharomyces cerevisiae*, é mediada primariamente pela ativação da cascata de complemento, com conseqüente produção da anafilotoxina C5a a qual se comporta como um potente fator quimiotático para neutrófilos (Calhoum *et al.*, 1987; Cuzzocrea *et al.*, 1997). A fase inicial da resposta inflamatória a este agente flogístico também parece depender de serotonina e leucotrienos, enquanto a fase mais tardia envolve a

participação do PAF, NO e liberação de prostaglandinas (Tarayre *et al.*, 1989; Cuzzocrea *et al.*, 1997; Pierreti *et al.*, 2006).

O edema causado pela formalina, diferentemente daquele causado pelos agentes flogísticos anteriores, desenvolve-se rapidamente por um mecanismo neurogênico envolvendo estimulação de fibras sensoriais aferentes primárias nociceptivas. Neste sentido, o processo inflamatório é fortemente dependente da liberação de substância P, outras taquicinininas e glutamato, por ativação direta das fibras pela formalina, ou indireta por intermédio da formação de bradicinina e liberação de histamina, serotonina e prostaglandinas por fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas (Wheeler-Aceto *et al.*, 1991; Doak & Sawynok, 1997; Dunka *et al.*, 1996; Damas & Liéglois, 1999; Beirith *et al.*, 2002). Além de causar edema, a formalina ainda induz respostas nociceptivas declaradas que se distribuem em duas fases. A primeira fase (também chamada de fase neurogênica) é atribuída à estimulação direta de nociceptores periféricos que integram as fibras aferentes primárias do tipo C e parte das do tipo A $\delta$  (Dubuisson & Dennis, 1977). A segunda fase (ou fase inflamatória) é mais tardia e duradoura (Hunskaar & Hole, 1987), e é decorrente dos mediadores mencionados anteriormente que, de forma conjunta e/ou sinérgica, sensibilizam as vias nervosas periféricas e centrais de condução dos sinais dolorosos (Fujimaki *et al.*, 1992; Santos & Calixto, 1997; Cao *et al.*, 1998; Omote *et al.*, 1998; Beirith *et al.*, 2002). Ambas as fases da resposta nociceptiva a formalina são separados por uma interfase quiescente, cuja duração e intensidade são determinadas pela ativação dos sistemas

monoaminérgicos descendentes, inibitório e excitatório, que modulam os sinais nociceptivos ao nível do corno dorsal da medula (Henry *et al.*, 1999).

O edema de orelha induzido por aplicação tópica de óleo de croton (De Young, 1989) envolve a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, com conseqüente biosíntese de prostaglandinas e leucotrienos (Furstenberger *et al.*, 1980; Kondoh *et al.*, 1980). O efeito edematogênico deste agente flogístico é determinado pela presença, no óleo, de ésteres de forbol que estimulam diretamente proteínas quinase C, ativando as vias de sinalização celular por elas controladas (Ingram *et al.*, 1991; Colorado *et al.*, 1991; Hara *et al.*, 1992).

O edema de pata induzido pela injeção i.pl. de CFA constitui um modelo de resposta inflamatória crônica, que persiste por pelo menos 21 dias e caracteriza-se pela infiltração massiva de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos (Larson *et al.*, 1985) e a participação de cininas, principalmente da bradicinina agindo em receptores B<sub>2</sub> (Ferreira *et al.*, 2001). A resposta inflamatória ao CFA também inclui o surgimento de alodínia mecânica (um componente da “dor inflamatória”), que é mediada pela sensibilização local de nociceptores e por mecanismos sistêmicos (sensibilização central) e imunes (aumento de níveis plasmáticos de citocinas) (Samad *et al.*, 2001). A manifestação desta alodínia mecânica é dependente ainda da ativação de receptores B<sub>1</sub> por cininas (Perkins *et al.*, 1993; Panesar *et al.*, 1998; Burgess *et al.*, 2000), bem como do aumento de produção de NGF em resposta à formação de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Safieh-Garabedian *et al.*, 1995; Woolf *et al.*, 1997; Verri *et al.*, 2006). Esta alteração nociceptiva causada

pelo CFA está associada, ainda, com um pronunciado aumento da expressão de receptores TRPV1 (Endres-Becker *et al.*, 2006).

Como pôde ser apreciado nos cinco parágrafos precedentes, há aspectos coincidentes e outros que distinguem os mecanismos celulares subjacentes a cada um dos modelos inflamatórios utilizados para investigar as ações antiinflamatórias do plumierídeo. A partir deste ponto, procurar-se-á discutir quais seriam os possíveis mecanismos pelos quais o plumierídeo poderia estar atuando, para causar seus potentes efeitos antiedematogênicos e anti-nociceptivos. Neste processo, far-se-á referência aos efeitos do plumierídeo sobre o edema de orelha induzido por alguns mediadores inflamatórios específicos em ratos, bem como suas propriedades analgésicas na hipernocicepção causada por constrição do nervo infraorbital nesta mesma espécie, um modelo de dor neuropática orofacial (Vos *et al.*, 1994).

A histamina e a serotonina, liberadas por mastócitos, poderiam ser potenciais alvos para a ação anti-inflamatória do plumierídeo, especialmente pelo fato destes serem importantes mediadores da inflamação induzida pela dextrana (Nishida *et al.*, 1979; Berstad, 1980; Lo *et al.*, 1982; Moodley *et al.*, 1982; Van Wauve & Goosens, 1989; Gupta *et al.*, 2005). Surpreendentemente, porém, apesar de inibir muito bem o edema de pata causado por dextrana, o plumierídeo não afetou o edema de orelha causado por histamina ou serotonina. Tais achados não excluem, entretanto, a possibilidade do plumierídeo inibir processos de degranulação de mastócitos, pois a ativação destas células acarreta liberação de vários fatores pró-inflamatórios adicionais,

como quimases, triptases e outras proteases, leucotrienos e citocinas (para revisão ver Ui *et al.*, 2005).

A substância P e outras taquicininas poderiam também constituir alvos relevantes do plumierídeo, uma vez que são neurotransmissores liberados por fibras aferentes nociceptivas primárias peptidérgicas que desempenham importantes papéis pró-inflamatórios (Wheeler-Aceto *et al.*, 1991; Dunka *et al.*, 1996; Doack & Sawynok, 1997) e nociceptivos (Fujimaki *et al.*, 1992; Santos & Calixto, 1997; Cao *et al.*, 1998; Omote *et al.*, 1998; Beirith *et al.*, 2002). No entanto, a demonstração de que o plumierídeo inibiu o edema de pata causado por formalina, mas não o seu efeito nociceptivo, aliado à resistência do efeito edematogênico da substância P na orelha ao bloqueio pelo composto, parecem descartar este peptídeo como o alvo de ação. De modo semelhante, o PAF (fator de ativação de plaquetas) também causou edema de orelha que não foi bloqueado pelo plumierídeo, embora este mediador contribua significativamente para a resposta inflamatória induzida por zimosano e alguns outros agentes flogísticos. Estes resultados parecem descartar a hipótese de que o bloqueio da liberação e/ou ação da histamina, serotonina, substância P e PAF, estejam envolvidos na mediação dos efeitos anti-inflamatórios do plumierídeo.

A bradicinina é um mediador pró-inflamatório que participa em quase todos os modelos nos quais a resposta inflamatória mostrou-se sensível à inibição pelo plumierídeo. Este peptídeo claramente apresenta efeitos edematogênicos e nociceptivos quando administrado em animais (Campos & Calixto, 1994; Dray, 1997; Calixto *et al.*, 2000; Blaukat *et al.*, 2003; Ueno & Oh-

Ishi, 2003; Wang *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2006). Além disso, o sistema de cininas está implicado no edema e dor provocados por vários agentes flogísticos. Neste sentido, a capacidade do plumierídeo em inibir o edema de orelha induzido por bradicinina poderia sugerir que a bradicinina seja um dos prováveis alvos da ação anti-inflamatória do composto. Embora essa possibilidade não possa ainda ser inteiramente descartada, chamam a atenção os relatos de que a nocicepção declarada causada pela formalina (que é resistente ao bloqueio pelo plumierídeo) é inibida, pelo menos parcialmente, por antagonistas de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para cininas ou pela deleção gênica destes receptores (Correa & Calixto, 1993; Campos *et al.*, 1995; Ueno & Ohishi, 2002; Chichorro *et al.*, 2004).

Por estarem profundamente implicados em diversos aspectos da resposta inflamatória, as vias de síntese de ou os mecanismos de sinalização celular controlados por mediadores derivados do ácido araquidônico constituem alvos potencialmente atraentes para ações do plumierídeo. Especificamente, há inúmeros exemplos de compostos derivados de plantas que apresentam capacidade de inibir a atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (Jachak, 2006), as enzimas responsáveis pela geração de prostanóides (Burian & Geisslinger, 2005; Marnett & Rouzer, 2005). No presente trabalho, verificou-se que a aplicação tópica de plumierídeo inibiu marcadamente o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos, com eficácia semelhante àquela exibida pelo naproxeno, um inibidor não seletivo de COX-1/COX-2 (Wallace, 1999). O edema de orelha provocado pelo ácido araquidônico em camundongos desenvolve-se rapidamente e envolve,

principalmente, a síntese de PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>4</sub> por ação de COX-1, bem como dos leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> formados através da via de síntese controlada pela 5-lipoxigenase (Opas *et al.*, 1985; Inoue *et al.*, 1988; Griswold *et al.*, 1998). Assim, a eficácia antiedematogênica do plumierídeo neste modelo poderia refletir uma atividade inibidora da COX-1. Porém, outras possibilidades, tais como inibição da lipoxigenase ou interferência com as ações dos prostanóides e/ou leucotrienos pertinentes neste modelo, necessitariam ser investigadas.

O presente trabalho obteve ainda duas linhas de evidência que não sustentam a hipótese de que o perfil anti-inflamatório do plumierídeo seja decorrente de uma ação inibitória sobre a COX. A primeira é constituída pelos resultados obtidos com o composto sobre a hipernocicepção orofacial induzida por constrição do nervo infraorbital, em ratos. Neste modelo de dor neuropática (e de neuralgia trigemial), originalmente proposto por Vos *et al.* (1994), foi verificado que a hipernocicepção a estimulação nociceptiva térmica (frio ou calor) ou mecânica é completamente resistente a redução por um inibidor não seletivo de COX-1 (indometacina) ou seletivo da COX-2 (celecoxib), e é pouco sensível à inibição pelo glicocorticóide dexametasona (Chichorro, 2006; Chichorro *et al.*, 2006). Entretanto, observou-se no presente trabalho que a administração oral de plumierídeo foi efetivo em reduzir, ainda que transitoriamente, tanto a hipernocicepção ao frio quanto ao calor, embora tenha se mostrado desprovido de efeito significativo contra a alodínia mecânica.

A segunda linha de evidência a refutar a hipótese de uma ação do plumierídeo sobre a COX advém da capacidade deste composto inibir de modo pronunciado o edema de orelha causado pela PGE<sub>2</sub> em camundongos. Foi

demonstrado recentemente que o edema causado pela PGE<sub>2</sub> nesta espécie envolve receptores do tipo EP<sub>3</sub> acoplados à ativação da PKC e MAPKs receptores TRPV1 possivelmente localizados em fibras aferentes primárias (Claudino *et al.*, 2006). A PGE<sub>2</sub> é um importante mediador pró-inflamatório e hipernociceptivo, como demonstram muitos estudos sobre seus papéis em muitos eventos do processo inflamatório, como a vasodilatação, eritema, aumento da permeabilidade vascular e dor (Raud *et al.*, 1990; James *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002). Neste sentido, ao menos no modelo do edema de orelha causado pela PGE<sub>2</sub>, o plumierídeo parece atuar ao nível dos receptores EP<sub>3</sub> ou em algum ponto das vias de sinalização celular controladas por eles para causar a resposta edematogênica.

Como a anafilatoxina C5a, um integrante da cascata de complemento ativada durante o processo inflamatório, é um potente agente quimiotático para neutrófilos (Calhoun *et al.*, 1987; Cruzocrea *et al.*, 1997) que participa ativamente na promoção do edema causado por zimosano (Calhoun *et al.*, 1987), investigou-se a sensibilidade do edema de orelha causada pelo C5a à inibição pelo plumierídeo. De fato, verificou-se que o composto foi capaz de inibir de modo expressivo o efeito edematogênico do C5a, o que sugere que o plumierídeo possa talvez agir sobre o receptor para esta anafilatoxina, ou os mecanismos de sinalização subseqüentes à sua ativação.

Em resumo, o conjunto de resultados deste trabalho indicam que o plumierídeo apresenta potente atividade inibitória sobre o desenvolvimento das fases aguda e/ou crônica da resposta inflamatória a diversos agentes flogísticos, bem como apresenta atividade anti-hipernociceptiva em modelos de

dor neuropática e dor inflamatória (induzida por CFA, mas não por formalina). Parte dos resultados sugere que estas ações do plumierídeo possam decorrer de sua interferência com mecanismos de sinalização celular mediadas por bradicinina, PGE<sub>2</sub> e/ou C5a, bem como de potente efeito inibitório sobre mecanismos de migração de leucócitos. Entretanto, é evidente que os estudos conduzidos até o momento são ainda insuficientes para esclarecer os verdadeiros alvos de ação do plumierídeo. Considerando a excelente biodisponibilidade exibida por este composto iridóide, sua elevada potência anti-inflamatória e a duração prolongada dos efeitos que produz, estudos adicionais que venham a determinar seus mecanismos de ação (incluindo possíveis ações contra lipooxigenases e citocinas, entre outros) podem resultar no desenvolvimento de uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da inflamação e da dor.

Como considerações finais desta discussão, julga-se importante especular sobre outros dois potenciais mecanismos de ação do plumierídeo: os receptores ativados por proteinases (PAR) e as fosfodiesterases. Receptores PAR<sub>4</sub> estão expressos na superfície de leucócitos, onde medeiam as alterações funcionais que resultam no rolamento intravascular e aderência endotelial dessas células induzidos pela trombina (Vergnolle *et al.*, 2002). Ao ativarem neutrófilos, os receptores PAR<sub>4</sub> aumentam a permeabilidade vascular e liberam calicreínas, que, por sua vez, clivam cininogênios (encontrados na superfície de neutrófilos) para produzir cininas, como a bradicinina. Neste sentido, antagonistas seletivos destes receptores são eficazes em inibir a resposta inflamatória induzida pela carragenina (Houles *et al.*, 2005). Por outro

lado, fosfodiesterases (PDE) são uma classe de isoenzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos cíclicos que atuam como mensageiros intracelulares importantes e polivalentes. Especificamente, a PDE4 é expressa de forma abundante por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos T, participando da resposta inflamatória, inclusive da induzida pelo zimosano e antagonistas de PDE4, como o rolipram, inibem tanto a nocicepção quanto o processo inflamatório (Huang *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2005). Recentemente, Pieretti *et al.* (2006) relataram que duas piridazinonas heterocíclicas, que apresentam maior seletividade que o rolipram em inibir a PDE<sub>4</sub> (relativamente à PDE<sub>3</sub>), apresentam marcada atividade anti-edematogênica no modelo de edema de pata causado por zimosano sem, contudo apresentarem efeitos analgésicos no modelo da formalina. Embora aquele trabalho não tenha investigado a eficácia destes compostos em inibir o edema da formalina, os efeitos descritos assemelham-se muito ao perfil de ação do plumierídeo.

## ***6. Conclusões***

---

---

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- A administração oral do composto plumierídeo inibiu significativamente a resposta inflamatória induzida por carragenina no modelo de edema de pata, tanto em ratos quanto em camundongos;
- O composto plumierídeo apresentou ótima biodisponibilidade oral;
- De maneira similar, o plumierídeo foi eficaz em inibir o edema de pata causado por zimosano e dextrana;
- A ação do plumierídeo parece ser independente da região corporal inflamada, uma vez que inibiu também o edema de orelha, tanto em ratos quanto em camundongos;
- Além dos eventos vasculares característicos de uma resposta inflamatória, como por exemplo, o aumento da permeabilidade vascular, o plumierídeo também foi eficaz em inibir a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos para o foco inflamatório;
- O plumierídeo inibe o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido por carragenina na pata de camundongos;
- O conjunto de resultados deste trabalho nos permite descartar a hipótese de que o bloqueio da liberação e/ou ação da histamina, serotonina, substância P e PAF, estejam envolvidos na mediação dos efeitos anti-inflamatórios do plumierídeo;

- Os resultados indicam também que o plumierídeo apresenta potente atividade inibitória sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória a diversos agentes flogísticos, bem como apresenta atividade anti-hipernociceptiva em modelos de dor neuropática e dor inflamatória (induzida por CFA, mas não por formalina);
- Parte destes resultados sugerem que estas ações do plumierídeo possam decorrer de sua interferência com mecanismos de sinalização celular mediadas por bradicinina, PGE<sub>2</sub> e ou C5a, bem como do potente efeito inibitório sobre mecanismos de migração de leucócitos;

Considerando a excelente biodisponibilidade exibida por este composto iridóide, sua elevada potência anti-inflamatória e a duração prolongada dos efeitos que produz, estudos adicionais que venham a determinar seus mecanismos de ação (incluindo possíveis ações contra lipooxigenase e citocinas, entre outros) podem resultar no desenvolvimento de uma alternativa terapêutica nova e importante para o tratamento da inflamação e da dor.

## ***7.Referências Bibliográficas***

---

---

Abe F; Chen RF; Yamauchi T. Studies on the constituents of *Plumeria*. Part I. Minor iridoids from the roots of *Plumeria acutifolia*. **1988**. Chem. Pharm. Bull. 36:2784-2789.

Aceto-Wheeler H, Cowan A. **1991**. Neurogenic and tissue mediated components of formalin – induced edema: evidence for supraspinal regulation. Agents Actions 34, 264-269.

Agrawal PK; Thakur, RS. **1985**. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. Magn. Reson. Chem. 23 (6) :389-418.

Ahmed B; Al-Rehaily AJ; Al-Howiriny TA; El-Sayed KA; Ahmad MS. **2003**. Scropolioside-D<sub>2</sub> and harpagoside-B: two new iridoid glycosides from *Scrophularia deserti* and their antidiabetic and antiinflammatory activity. Biol. Pharm. Bull. 26 (4): 462-467.

Baccaglioni PL & Hogan PG. **1983**. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differential pain sensory cells. Proc Natl Acad Sci USA 80(2), 594-598.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. **2006**. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol. 57:233-266.

Basbaum AI, Julius D. **2006**. Toward better pain control. Sci. Am. 294(6):60-67.

Basso LA, Da Silva LH, Fett-Neto AG, De Azevedo WF Jr., Moreira I de S, Palma MS, Calixto JB, Astolfi Filho S, Dos Santos RR, Soares MB, Santos DS. **2005**. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100(6): 475-506.

Beirith A, Santos AR, Calixto JB. **2002**. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. Brain Res., 2:219-228.

Berstad J. **1980**. Dextran-induced release of serotonin from isolated rat peritoneal mast cells. Acta Pharmacol Toxicol 47:213-216.

Bertin C, Paul RN, Duke SO, Weston LA. **2003**. Laboratory assessment of the allelopathic effects of fine leaf fescues. *J Chem Ecol.* 29(8): 1919-1937.

Bertin P, Behier JM, Noel E, Leroux JL. **2003**. Celecoxib is as efficacious as naproxen in the management of acute shoulder pain. *J Int Med Res.* 31(2): 102-112.

Besson JM. **1999**. The neurobiology of pain. *Lancet.* 8; 353 (9164): 1610-1615.

Blaukat A. **2003**. Structure and signalling pathways of kinin receptors. *andrologia* 35, 17–23.

Brito ARMS, Antonio MA. **1998**. Oral anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract portioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *J. Ethnopharmacol.* 61, 215-228.

Bortolini KA, Santos-Silva JE. **2001**. Estudos químicos e farmacológicos da espécie vegetal *Allamanda cathartica*. Blumenau. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Regional de Blumenau.

Broche F, Tellado JM. **2001**. Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin. Crit. Care.* 7(2):105-116.

Burgess GM, Perkins MN, Rang HP, Campbell EA, Brown MC, McIntyre P, Urban L, Dziadulewicz EK, Ritchie TJ, Hallet A, Snell CR, Wrigglesworth R, Lee W, Davis C, Phagoo SD, Davis AJ, Phillips E, Drakc GS, Hughes GA, Dunstan A, Bloomfield GC. **2000**. Bradzide, a potent non-peptidic B<sub>2</sub> bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 129, 77-86.

Burian M, Geisslinger G. **2005**. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol. Ther.* 107: 139–154.

Calhoun W, Chang J, Carlson RP. **1987**. Effect of selected antiinflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF and carrageenan induced paw edema in the mouse. *Agents Actions* 21(3-4):306-309.

Calixto JB, Santos AR, Cechinel Filho V, Yunes RA. **1998**. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev.* 18(4): 225-258.

Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. **2000**. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87: 1-5.

Calixto JB, Otuki MF, Santos AR. **2003**. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-Kappa B). *Planta Med.* 69(11):973-983.

Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. **2004**. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, Chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2):93-103.

Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Cabrini DA, Campos MM. **2004**. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 143(7):803-818.

Campos MM, Mata LV, Calixto JB. **1995**. Expression of B<sub>1</sub> kinin receptors mediating paw edema and formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids. *Can J Physiol Pharmacol.* 73(7):812-819.

Campos MM, Leal PC, Rosendo AY, Calixto JB. **2006**. Non-peptide antagonists for kinin B<sub>1</sub> receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Tr. Pharmacol Sci.* 27 (12): 646-651.

Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJH, Basbaum AI. **1998**. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature.* 392: 390-394.

Carlson RP, O'Neil-Davis L, Chang J, Lewis AJ. **1985**. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions* 17(2):197-204.

Carr DB, Goudas LC. **1999**. Acute Pain. *Lancet.* 12: 353(9169):2051-2058.

Chen, Y.; Devor, M. **1998**. Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. *Eur. J. Pain* 2(2):165-178.

Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Wishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodget JR, Oliveirados-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM. **2002**.

DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108(1):31-43.

Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zamprônio AR. **2004**. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol.* 141(7):1175-1184.

Chichorro JE. **2006**. Neuralgia do Trigêmio: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental. Florianópolis. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Chichorro JG, Zamprônio AR, Souza GE, Rae GA. **2006**. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain.* 123 (1-2):64-74.

Claudino RF, Kassuya CAL, Ferreira J, Calixto JB. **2006**. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-induced mouse paw edema. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(2): 611-618.

Colorado A, Sema JT, Slavinoha WB. **1991**. A new method for measuring auricular inflammation in the mouse. *J. Pharmacol Methods.* 26(1): 73-77.

Coppen JJW; Cobb AL. **1983**. The occurrence of iridoids in *Plumeria* and *Allamanda*. *Phytochem.* 22: 125-128.

Correa CR & Calixto JB. **1993**. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive responses in the mouse. *Br J Pharmacol.* 110(1):193-198.

Cunha, T.M.; Verri, W. A. Jr, Vivancos, G. G.; Moreira, I. F.; Reis, S.; Parada, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. **2004**. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(3):401-407.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Calapi G, Nava F, Caputi AP. **1997**. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. *Life Sciences* 60 (3): 215-220.

Damas J & Liégeois F. **1999**. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 359:220-227.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. **1989**. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26:335-341.

Devor M. **2006**. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J. Pain* 7(Suppl 1):S3-S12.

Dickenson, A. H.; Matthews, E. A.; Suzuki, R. **2002**. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur. J. Pain* 6: 51-60.

Dey RD and Hoffpauir J. **1984**. Ultrastructural immunocytochemical localization of 5-hydroxytryptamine in gastric enterochromaffin cells. *J Histochem Cytochem* 32: 661-666.

DiRosa M, Giroud JP, Willoughby DA. **1971**. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 104: 15-29.

Doak GJ, Sawynok J. **1997**. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience.* 80(3):939-949.

Dray A. **1997**. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol.* 75(6):704-712.

Dubuisson D, Dennis SG. **1977**. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain;* 4: 161-174

Dunka VK, Tandan SK, Tripathi HC, Raviprakash V. **1996**. Central serotonergic and histaminergic modulation of peripheral inflammation and nociception in rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 40(2): 163-6.

Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Shafer M, Stein C, Zollner C. **2006**.  $\mu$ -Receptor activation modulate TRPV1 currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Molec. Pharmacol.* 71(1):12 - 18.

Ferreira SH. **1981**. Local control of inflammatory pain. *Agents Actions* 11(6-7), 636-38.

Ferreira SH, Zanin T, Lorenzetti BB, de Souza MZ, Medeiros MC, Leme JG. **1978**. Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenin in the rat's paw proceedings. *Agents Actions* 8(1-2):159.

Ferreira SH & Nakamura M. **1979a**. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins* 18(2): 179-190.

Ferreira SH & Nakamura M. **1979b**. II. Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins* 18(2):191-200.

Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Calixto JB. **2001**. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41(8):1006-1012.

Flores R, Navarro JA, De La Pena M, Navarro B, Ambros S, Vera A. **1999**. Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *Biol. Chem.* 380(7-8):849-854.

Fujumaki H, Hawagoe A, Bissonette E, Befus D. **1992**. Mast cell response to formaldehyde modulation of mediator release. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 98:324-332.

Fürst S. **1999**. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 15;48(2):129-141.

Furstenberger G, Marks F. **1980**. Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of cell proliferation in mouse epidermis in vivo by the phorbol ester TPA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12;92(3):749-756.

Griswold, D.E., Martin, L.D., Badger, A.M., Breton, J., Chabot-Fletcher, M., **1998**. Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azapiranes. *Inflamm. Res.* 47, 56-61.

Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. **2007**. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nature Rev. Immunol.* 7(1):52-63.

Gulati OP, Sharma SC, Hammersen F. **1983**. Hemodynamic, biochemical and morphological changes in the dextran and D-galactosamine-induced edemas in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 263(2): 272-287.

Gupta RA, Dubois RN. **2002**. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1(1):11-21.

Gupta RS; Bhatnager AK; Joshi C; Sharma; Sharma A. **2004**. Effects of plumieride, an iridoid on spermatogenesis in male albino rats. *Phytomedicine* 3 (11): 169-174.

Gupta M, Mazumder UK, SAmbath Kumar R, Gomathi P, Rajeshwar Y, Kakoti BB, Tamil Selven V. **2005**. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract form *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. *J. Ethnopharmacol.* 98: 267-273.

Hamburger MO; Cordel GA; Ruangrunsi N. **1991**. Traditional medicinal plants of Thailand. XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. *J. Ethnopharmacol.* 33 (3): 289-292.

Hao, J.X.; Yu, W.; Xu, X. J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.. **1996**. Capsaicin-sensitive afferents mediate chronic cold, but not mechanical, allodynia-like behavior in spinally injured rats, *Brain Res.*, 722: 177-180.

Hara H, Sukamoto T, Ohtaka H, Tatumi Y, Saito Y, Suzuki A, Tsukamoto G. **1992**. Effects of baicalein and alpha-tocopherol on lipid peroxidation, free radical scavenging activity and 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced ear edema. *Eur J. Pharmacol.* 221(2-3): 193-198.

Harada Y, Tanaka K, Uchida Y, Ueno A, Oh-Ishi S, Yamashita K, Ishibashi M, Miyazaki H, Katori M. **1982**. Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy – a profile analysis using gas chromatography – mass spectrometry. *Prostaglandins* 23: 881-895.

Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., Phipps, R.P., **2002**. Prostaglandins as modulators of immunity. *Tr. Immunol.* 3: 144–150.

Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RS. **1987**. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20(2):243-249.

Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. **1999**. Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* 89:57-63.

Herschmam HR. **1996**. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* 5: 1299(1):125-140.

Horakova Z, Bayer BM, Almeida AP, Beaven MA. **1980**. Evidence that histamine does not participate in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Eur. J Pharmacol.* 62: 17-25.

Huang Z, Ducharme Y, Macdonald D, Robichaud A. **2001** The next generation of PDE4 inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 432-438.

Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. **2005**. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 146: 670-678.

Huere, M.R., Gounon, P. **1996**. Inflammation: patterns and new concepts. *Res. Immunol.* 147(7):417-434.

Hunskar S, Hole K. **1987**. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103-114.

Hye Kyung Ju; Suk-Hwan Baek; Rem –Bo An; Ki Hwan Bae; Kum Ho Som; Hjun Pyo Kim; San Sik Kang; Sum Ho Lee; Jong Keum Som e Hyeun Wook Chang. **2003**. Inhibitory effects of nardostachin on nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, and tumor necrosis factor –Alpha production in lipopolysaccharide activated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* 26 (10): 1375-1378.

Iadarola JM, Caudle RM. **1997**. Good pain, bad pain. *Science* 278:239-240.

IASP. **1983**. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 6:109.

Inderjit, Duke SO. **2003**. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta Medica.* 217(4):529-539.

Ingram AJ, Grasso P. **1991**. Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in mouse skin. *Mutat. Res.* 248 (2):333-340.

Inoue, H., Mori, T., Koshihara, Y., **1988**. Sulfidopeptideleukotrienes are major mediators of arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Prostaglandins* 36, 731–740.

Jachak, Sanjay M. **2006**. Cyclooxygenase Inhibitory Natural Products: Current Status. *Curr. Med. Chem.* 13 (6): 659-678.

James, M.J., Penglis, P.S., Caughey, G.E., Demasil, M., Cleland, L.G., **2001**. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? *Inflamm. Res.* 50, 249–253.

Jeon YH, Heo YS, Kim CM, Hyum YL, Lee TG, Ro S, Cho JM. **2005**. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cel. Mol. Life Sci.* 62: 1198-1220.

Jewers K; Manchanda AH;Castillo AV. **1971**. Constituents of *Allamanda cathartica*. *Asian J Pharm.* 2:5-8.

Julsing MK, Koulmam A, Woerdenberg HJ, Quax WJ and Kayser O. **2006**. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biom. Eng.* 23:265-279.

Kardono LBS; Tsauri S; Padmawinata K; Pezzuto JM; Kinghorn AD. **1990**. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. *J. Nat. Prod.* 53(6): 1447-1455.

Kondoh H, Sato Y, Kanoh H. **1980**. Arachidonic acid metabolism in cultured mouse keratinocytes. *J. Inv. Dermatol.*, 85, 64-69.

Koehn, F. E. and G. T. Carter. **2005**. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4(3):206-220.

Kulkarni SK, Mehta AK, Kunchandy J. **1986**. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. *Arch. Int. Pharmacod. Ther.* 279(2):324-334.

Kupchan SM, Hemingway RJ, Smith RM. **1969**. Tumor inhibitors. XLV. Crotepoide, a novel cyclohexane diepoxide tumor inhibitor from Croton macrostachys. J Org. Chem. 34: 3898-3902.

Kupchan SM; Dessertine AL; Blaylock BT; Bruan, RF. **1974**. Isolation and structural elucidation of allamandin, an antileukemic iridoid lactone from Allamanda cathartica. J. Org. Chem. 17 (39): 2477-2487.

Larson AA, Brown DR, El-Atrash S, Walser MM. **1985**. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. Pharmacol. Biochem. Behav. 24;49-53.

Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. **2002**. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2(10):787-795.

Levine JD, Taiwo Y. **1994**. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain, 3 rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingtone, 45-56.

Levy, J.H. **1996**. The human inflammatory response. J. Cardiovasc. Pharmacol., 27 (supl. 1) S31-S37.

Lindemann SW, Weirich AS, Zimmermann GA. **2005**. Signaling to translational control pathways: diversity in gene regulation in inflammatory and vascular cells. Tr. Cardio. Med. 15 (1) 9-17.

Liu, C. N.; Michaelis, M.; Amir, R.; Devor, M. **2000**. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. J. Neurophysiol., 84(1):205-215.

Lo TN, Almeida AP and Reaven MA. **1981**. Indomethacin inhibits increased vascular permeability after intrapleural injection of carrageenan into rat but does not impair generation of neutrophil chemotactic factors. Fed. Proc. 50:1637.

Lyons CR. **1995**. The role of nitric oxide in inflammation. Adv. Immunol. 60: 323-371.

Malheiros A; Schuquel ITA; Vidotti GJ. **1997**. Atribuição inequívoca de deslocamentos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de plumierídio isolado de *Allamanda cathartica*. Química Nova. (20) 5: 457-459.

Marnett CA, Rouzer LJ. **2005**. Structural and functional differences between cyclooxygenases: Fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling. Bioch. Biophys. Res. Com. 338: 34-44.

Mathews, E. S.; Scrivani, S. J. **2000**. Percutaneous stereotactic radiofrequency thermal rhizotomy for the treatment of trigeminal neuralgia. Mt. Sinai J. Med., 67(4):288-299.

Millan MJ. **1999**. The induction of pain: an integrative review. Prog. Neurobiol. 57: 1-164.

Moodley I, Mongan JL, Foreman JC. **1982**. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. Eur. J. Pharmacol. 83: 69-81.

Mossner R, Lesch KP. **1998**. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interaction. Brain Behav. Immun. 12: 249-271.

Munro JM. **1993**. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. Eur. Heart J. 14 Suppl K:72-7.

Nagata K, Fujimiva M, Sugiura H, Uehara M. **2001**. Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. Histochem. J. 33:559-568.

Nayak S, Nalabothu1 P, Sandiford1 S, Bhogadi1V and Adogwa A. **2006**. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica*. L. and *Laurus nobilis*. L. extracts on rats. BMC Complem. Altern. Med. 6(12): 1-6.

Nishida S, Kagawa K, Tomizawa S. **1979**. Dextran-induced paw edema and 5-hydroxytryptamine release. Biochem. Pharmacol. 28, 3149-3150.

Okajima K, Harada N. **2006**. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanisms and possible therapeutic applications. Curr. Med. Chem. 13 (19): 2241-2251.

Omote K, Kawamata T, Kawamata M, Namiki A. **1998**. Formalin induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Res.*, 787: 161-164.

Opas EE, Bonney RJ, Humes JL. **1985**. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* 84(4):253-256.

Otero R; Núñez V; Barona J; Fonnegra R; Jimenez SL; Osorio RG; Sadarriaga M; Díaz A. **2000**. Snake bites and ethnobotany in the northwestern region of Colombia: Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J. Ethnopharmacol.* 73: 233-241.

Panesar MS, Gentry CT, Urban L, Walker K, Fox A. **1998**. A model of persistent, inflammation-induced mechanical hyperalgesia in the mouse. *Br J Pharmacol.* 125 (1): 122 – 128.

Pieretti S, Dominici L, Giannuario AD, Cesari N, Piaz VD. **2006**. Local anti-inflammatory effect and behavioral studies on new PDE4 inhibitors. *Life Sciences* 79:791-800.

Park KA, Vasko MR. **2005**. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. *Tr. Pharmacol. Sci.* 26(11):571-577.

Perkins MN, Campbell E, Dray A. **1993**. Antinociceptive activity of the bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonists, des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-BK and Hoe 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 53 191-197.

Pinheiro RM, Calixto JB. **2002**. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.* 51(12):603-610.

Portanova, J.P., Zhang, Y., Anderson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L., Seibert, K., Gregory, S.A. & Isakson, P.C. **1996**. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 883 - 891.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. **2004**. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142: 331-338.

Qia Jia; Mei- Feng Hong e David Minter. **1999**. Pikuroside: A novel iridoid from *Picrorhiza kurroa*. 62: 901-903. J. Nat. Prod. 62(6):901-903.

Rang HP, Bevan S, Dray A. **1994**. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall PD, Melzack R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, 57-78.

Rates SMK. **2001**. Plants as sources of drugs. Toxicon, 39:603-613.

Raud J. **1990**. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute most cell dependent inflammation . Br. J. Pharmacol. 99(3): 449-454.

Rocha Silva M. **1978**. A brief survey of the history of inflammation. Agents Actions. 43(3-4):86-90.

Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. **1995**. Contribution of interleukin – 1 beta to the inflammation- induced increase in nerve growth factor levels an inflammatory hyperalgesia. Br. J. Pharmacol. 115(7): 1265-1275.

Salvemini D, Wang ZO, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. **1996**. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Prhamacol. 118(4):829-838.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchome A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. **2001**. Interleukin- 1  $\beta$  – mediated induction of Cox -2 in the CNS contributes in inflammatory pain hypersensitivity. Nature 410, 471-475.

Sampaio-Santos MI, Kaplan MAC. 2001. Biosynthesis significance or iridoids in chemosystematics. J. Braz. Chem. Soc. 12(2):144-153.

Santos AR, Calixto JB. **1997**. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides, 31: 381-389.

Scrivani, S. J.; Mathews, E. S.; Maciewicz, R. J. **2005**. Trigeminal neuralgia. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 100(5):527-538.

Sedgwick AD, Moore AR, Al-Duaij AY, Edwards JC, Willoughby DA. **1985**. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. *Br. J. Exp. Pathol.* 66(4):455-464.

Sedgwick AD and Lees P. **1986**. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* 18(3):439-446.

Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. **1994**. Pharmacological and biochemical demonstration of the role cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (25):12013-12017.

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J. & Isakson, P. **1997**. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 400A, 167 - 170.

Schapoval EE, Vargas MR, Chaves CG, Briiri R, Zuanazzi JA, Henriques AT. **1998**. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *J. Ethnopharmacol.* 60(1):53-59.

Sharma, J.N., Buchanan, W.W. **1994**. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp. Toxicol. Pathol.* 46: 421- 433.

Shen Y; Chen C. **1986**. Allaneroside and bioactive iridoid glycosides from *Allamanda neriifolia*. *J.Taiwan Pharmaceut. Assoc.* (38) 4: 203-213.

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. **1989**. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38(3):347-352.

Shir Y, Seltzer Z. **1990**. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosc. Lett.* 115(1): 62-67.

Springer TA. **1994**. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 28; 76(2):301-314.

Sui-Kiong Ling; Takashi Tanaka and Isao Koumo. **2003**. Effects of iridoids on lipoxigenase and hyaluronidase activities and their activation by  $\beta$ -glucosidase in the presence of amino acids. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 352-356.

Tan GT; Pezzuto JM; Kinghorn AD. **1991**. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* (54) 1: 143-154.

Tarayre Jp, Delhon A, Aliaga M, Barbara M, Bruniquel F, Caillol V, Puech L, Consul N, Tisne-Versailles J. **1989**. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice.1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice. *Pharmacol. Res.* 21(4):375-384.

Tirpathi SC, Dixit SN. **1977**. Fungitoxic properties of *Rosa chinensis* Jacq. *Experientia.* 15;33(2):207-209.

Tiwari TN; Pandey VB; Dubey NK. **2002**. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent. *Phytother. Res.* 16: 393-394.

Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Stepankova R, Hudcovic T, Palova-Jelinkova L, Kozakova H, Rossmann P, Sanchez D, Cinova J, Hrncu T, Kverka M, Frolova L, Uhliz H, Powrie F, Bland P. 2005. Involvement of innate immunity in the development diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051: 787-798.

Tonussi CR & Ferreira SH. **1994**. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur. J. Pharmacol.* 251(2-3), 173-179.

Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y. **2006**. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 530(1-2):172-8.

Ueno A, Naraba H, Ikeda Y, Ushikub F, Murata T, Narumiya S, Oh-Ishi S. **2000**. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw oedema induced in IP-receptor-deficient mice. *Life Sci.* 66, 155-160.

Ueno A & Oh-Ishi S. **2002**. Critical roles of bradykinin and prostanoids in acute inflammatory reactions: a search using experimental animal models. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy* 1(4):363-376.

Ueno A & Oh-Ishi S. **2003**. Roles for the Kallikrein-Kinin system in inflammatory exudation and pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. *J Pharmacol. Sci.* 93, 1 – 20.

Van Wauve JP, Goosens JG. **1989**. Arabinolactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1- antihistamines, 5- HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. *Agents Actions* 28, 78-82.

Vergnolle N, Derian CK, D'Abdrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. **2002**. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J. Immunol.* 169(3):1467-1473.

Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. **1969**. Biphasic development of carrageenan oedema in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 96-103.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. **2006**. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.* 112: 116-138.

Vos B. P.; Maciewicz R. J. **1991**. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. *Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain*, Amsterdam: Elsevier., pp. 147-158.

Wahl SM, Fedman GM, Mc Crthy JB. **1996**. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *J. Leukoc. Biol.* 59(6):789-796.

Wallace JL. **1999**. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *AM J. Med.* 13, 107(6A): 115-165.

Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf C. **2006**. Bradykinin and peripheral sensitization. *J. Biol. Chem.* 387:11–14.

Waxman, S. G.; Cummins, T. R.; Dib-Hajj, S.; Fjell, J.; Black, J. A. **1999**. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve*, 22(9):1177-1187.

Weber C. **2003**. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med.* 81(1):4-19.

Wei X; Xie H; Ge X; Zhang F. **2000**. Iridoids from *Dunnia sinensis*. *Phytochemistry* 53: 837-840.

Wedmore CV, Williams TJ. **1981**. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289: 646-650.

Wink M. **2003**. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1):3-19.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. **1962**. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111:544-547.

Wheeler-Aceto, H., Cowan, A., **1991**. Neurogenic and tissue mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. *Agents Actions* 34, 264–269.

Wood JN, Docherty R. **1997**. Chemical activators of sensory neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 59:57-82.

Woolf CJ, Salter MW. **2000**. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 28(5472): 1765-1769.

Woolf, C. J. **2004**. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* 74(21):2605-2610.

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