

**GISELLE GUGINSKI**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO  
EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DA *Melissa officinalis* L.**

Florianópolis/SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO  
ETANÓLICO OBTIDO DA *Melissa officinalis* L.**

**GISELLE GUGINSKI**

Dissertação apresentada ao Programa 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: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

Florianópolis/SC

2007

GUGINSKI, Giselle . **Análise das propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Melissa officinalis* L.** Florianópolis, 2007. 110 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Professor Doutor Adair Roberto Soares dos Santos

Defesa: 28/09/2007

O presente estudo analisou a possível ação antinociceptiva do extrato etanólico (EE) obtido da *Melissa officinalis* em modelos de nocicepção química, mecânica e térmica em camundongos e ratos. O EE administrado pela via oral (v.o.), 1 h antes do teste, inibiu significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, bem como as duas fases do teste da formalina e a nocicepção mediada por glutamato. Além disso, o ácido rosmarínico (0.3-3 mg/kg, v.o.), presente em grandes quantidades no EE, administrado 60 min antes do teste, também reduziu de forma dependente da dose a nocicepção induzida pelo glutamato. O EE ainda mostrou-se eficaz em reverter a nocicepção causada pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos por até 12 horas e parece não induzir tolerância e nem ter efeito cumulativo com o tratamento prolongado. Além disso, o EE foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela injeção intraplantar de BK, PGE<sub>2</sub> e PMA. Igualmente, o EE foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da colite induzida por injeção retal de ácido acético. O EE facilitou a aquisição e a retenção da memória de longa e curta duração, quando analisado no modelo da esquiva inibitória em ratos, facilitação esta revertida pelo pré-tratamento dos animais via i.p. com MK-801, L-NAME, mecamilamina e atropina. A antinocicepção ou facilitação da memória causada pelo EE não está associada a efeitos inespecíficos, como relaxamento muscular ou sedação. Em conjunto, estes resultados sugerem que o EE de *Melissa officinalis* apresenta importante atividade antinociceptiva em vários modelos experimentais de nocicepção e inflamação em camundongos e ratos, além de atividade facilitadora da memória em ratos no modelo da esquiva inibitória. O seu mecanismo de ação antinociceptiva e facilitadora da memória não estão completamente esclarecidos, mas o presente estudo mostrou que esta ação é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os sistemas glutamatérgico, colinérgico e com a via L-arginina-óxido nítrico.

Palavras - chave: *Melissa officinalis*, nocicepção, memória

De tudo ficaram três coisas...

**A certeza de que estamos começando...**

**A certeza de que é preciso continuar...**

**A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar...**

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!"

(Fernando Sabino)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Evaldo e Marilda, que sempre me apoiaram, cada um a sua forma, e que foram determinantes e indispensáveis para que eu conseguisse galgar mais este degrau. Muito Obrigada!

Ao meu namorado, Rafael, que mesmo a distância sempre me apoiou, compreendeu e ajudou! Muito obrigada meu amor!

A todos os demais familiares que de alguma forma contribuíram para minha formação, interesse pela pesquisa e que sempre torceram pelo meu sucesso.

Às minhas amigas distantes, porém sempre muito presentes de alguma forma, Marina e Denise, quase nem nos vemos mais, mas passe o tempo que passar vocês sempre serão muito especiais pra mim! Amo vocês!

Ao pessoal do Laboratório, nunca houve, há, nem haverá no mundo pessoas mais legais que vocês!

Ao Ney, que me auxiliou sempre, desde o início, até antes do início, me ajudando a estudar para a prova de seleção! Muito obrigada!

À Ana, o Rodrigo, a Dani e a Morgana pelas valiosas correções das versões preliminares.

À Fabi, a Flávia, a Vanessa, a Liana e a Ana! Alguns dos melhores momentos dos meus últimos anos, passei ao lado de vocês. Obrigada pelo companheirismo!

À Morgana, pela amizade! Jamais pensei que tanta coragem, capacidade, doçura e amizade coubessem dentro de alguém tão pequenininha!

Ao Fábio "Gaúcho", pela amizade e pelo auxílio na realização de algumas técnicas.

À Débora, porque nela descobri uma irmã mais nova e semelhanças que vão além da aparência física, te adoro... Mas toma juízo menina!

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial, Diana, Nivaldo, Seu Carlos e Dona Vilma, que colaboraram imensamente para a realização deste trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Farmacologia e aos da Pós-graduação em Neurociências, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Centroflora e à Doutora Elizabeth Teràn (*in memorian*) pelo fornecimento do material vegetal.

A CAPES, CNPq, PRONEX, FAPESC e UFSC pelo suporte financeiro.

"...Desejo a vocês, folhas da minha árvore. Paz, Amor, Saúde,  
Sucesso, Tranquilidade e Prosperidade. Hoje e sempre...  
Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossas vidas é única.  
Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós.  
Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada.  
Esta é a maior responsabilidade de nossas vidas  
E a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso!"

(Antoine de Saint-Exupéry)

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Produtos naturais.....	1
1.2. <i>Melissa officinalis</i> L. subsp. <i>officinalis</i> .....	4
1.3. Dor.....	7
1.3.1. Dor inflamatória.....	16
1.3.2. Dor neuropática.....	17
1.4. Memória.....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Animais.....	31
3.2. Material botânico.....	31
3.3. Drogas.....	32
3.4. Nocicepção induzida pelo ácido acético.....	33
3.5. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	34
3.6. Nocicepção induzida pela formalina.....	34

3.7. Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático.....	35
3.8. Hiperalgisia induzida por mediadores inflamatórios.....	36
3.9. Indução de colite por injeção intra-retal de ácido acético.....	37
3.10. Avaliação da atividade locomotora: Teste do campo aberto (open-field).	38
3.11. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do EE de <i>Melissa officinalis</i> .....	38
3.11.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico, da substância P e das citocinas pró inflamatórias .....	39
3.11.2. Envolvimento do sistema opióide.....	40
3.11.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	41
3.11.4. Envolvimento do sistema colinérgico.....	41
3.12. Efeito do ácido rosmarínico no modelo do glutamato .....	42
3.13. Esquiva inibitória.....	42
3.14. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE de <i>Melissa officinalis</i> na facilitação da memória.....	43
3.14.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico.....	43
3.14.2. Envolvimento do sistema colinérgico.....	44
3.14.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	44
3.15. Análise estatística.....	45
<b>4. RESULTADOS</b> .....	46
4.1. Nocicepção induzida pelo ácido acético.....	46
4.2. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	47
4.3. Nocicepção induzida pela formalina.....	47
4.4. Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático.....	49

4.5. Hiperalgesia induzida por agentes flogísticos.....	51
4.6. Indução de colite por injeção intra-retal de ácido acético.....	53
4.7. Avaliação da atividade locomotora: Teste do campo aberto (open-field)..	55
4.8. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do EE de <i>Melissa officinalis</i> .....	56
4.8.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico, da substância P e das citocinas pró inflamatórias .....	56
4.8.2. Envolvimento do sistema opióide.....	58
4.8.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	59
4.8.4. Envolvimento do sistema colinérgico.....	60
4.9. Efeito do ácido rosmarínico no modelo do glutamato.....	61
4.10. Esquiva inibitória.....	62
4.11. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE de <i>Melissa officinalis</i> na facilitação da memória.....	63
4.11.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico.....	63
4.11.2. Envolvimento do sistema colinérgico.....	64
4.11.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	66
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha_2\beta_3$	Receptor nicotínico tipo $\alpha_2\beta_3$ , predominantemente neural
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{mol}$	Micromol
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPC</b>	Monofosfato cíclico de 3'5' -adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>B<sub>2</sub></b>	Receptor de Bradicinina tipo 2
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>Cainato</b>	Ácido caínico
<b>CaMKII</b>	Cálcio calmodulina quinase II
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose que inibe a resposta em 50%
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>EE</b>	Extrato etanólico
<b>eNOS</b>	Sintase de óxido nítrico endotelial
<b>EP</b>	Receptor de Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>ERK</b>	Proteína quinase reguladora de sinal extracelular

<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -amino butírico
<b>GABA<sub>B</sub></b>	Receptor de Ácido $\gamma$ -amino butírico tipo B
<b>GC</b>	Guanilato ciclase
<b>GMP<sub>c</sub></b>	Monofosfato cíclico de 3'5' - guanosina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol
<b>i.pl.</b>	Intraplantar
<b>i.t.</b>	Intratecal
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>iNOS</b>	Sintase de óxido nítrico induzida
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>L-NOARG</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
<b>L-NAME</b>	Nitro-L-arginina-metil-éster
<b>LTM</b>	Memória de longa duração
<b>LTP</b>	Potencial de longa duração
<b>M<sub>1</sub></b>	Receptor colinérgico muscarínico do tipo 1 ou neural
<b>mA</b>	Mili Ampere
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógenos
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Íon magnésio
<b>mg/kg</b>	Miligramas por quilograma
<b>mGluR</b>	Receptor glutamatérgico metabotrópico
<b>MK-801</b>	Maleato de dizocilpina
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NAL</b>	Cloridrato de naloxona

<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase de óxido nítrico
<b>PC -12</b>	Linhagem de células derivadas de feocromocitoma
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PMA</b>	forbol 12- miristato 13-acetato
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>RYR</b>	Receptor de Rianodina
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>SP</b>	Substância P
<b>STM</b>	Memória de curta duração
<b>trans-ACPD</b>	Ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília
<b>v.o.</b>	Via oral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Folhas (A) e flores (B) da <i>Melissa officinalis</i> .....	5
<b>Figura 2:</b> Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	11
<b>Figura 3:</b> Formação da memória de longa duração.....	22
<b>Figura 4:</b> A fase precoce do LTP independe de síntese de proteínas.....	25
<b>Figura 5:</b> Todas as fases do LTP se comunicam através da via da Quinase regulada por sinal extracelular(ERK).....	26
<b>Figura 6:</b> Avaliação do efeito antinociceptivo (3-1000 mg/kg, v.o.) do EE de <i>Melissa officinalis</i> na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% (450 µl, i.p.) em camundongos.....	46
<b>Figura 7:</b> Avaliação do efeito antinociceptivo do EE de <i>Melissa officinalis</i> (10-1000 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida por glutamato tamponado (20 µmol/pata) em camundongos.....	47
<b>Figura 8:</b> Efeito antinociceptivo do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30-1000 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos.....	48
<b>Figura 9:</b> Decurso temporal do efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	49
<b>Figura 10:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) 2 (A) e 10 (B) horas após o tratamento diário, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	50

<b>Figura 11:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (10 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de bradicinina (BK, 3 nmol/pata) em ratos.....	51
<b>Figura 12:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (3 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de Prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> , 10 nmol/pata) em ratos.....	52
<b>Figura 13:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (10 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de PMA (0,1 nmol/pata) em ratos.....	52
<b>Figura 14:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30 - 300 mg/kg, v.o.) na prevenção de lesão no cólon de animais que receberam ácido acético (5%, 150 µl) por via retal.....	53
<b>Figura 15:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30 - 300 mg/kg, v.o.) e da Dexametasona (2 mg/kg, v.o.) no peso do baço (A) e do cólon (B) de animais que receberam ácido acético (5%, 150 µl) por via retal.....	54
<b>Figura 16:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30 - 300 mg/kg, v.o.) sobre a atividade locomotora de camundongos avaliados no modelo do campo aberto	55
<b>Figura 17:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30 - 1000 mg/kg, v.o.) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados no modelo do campo aberto.....	56
<b>Figura 18:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP em camundongos.....	57
<b>Figura 19:</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias em camundongos.....	58

<b>Figura 20:</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	59
<b>Figura 21:</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (40 mg/kg i.p.) ou D-arginina (40 mg/kg i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) e L-NOARG (25 mg/kg, i.p.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	60
<b>Figura 22:</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com mecamilamina (2 mg/kg, i.p., <b>A</b> ) ou atropina (1 mg/kg, i.p., <b>B</b> ) sobre a atividade antinociceptiva da nicotina (1 mg/kg, i.p., <b>A</b> ) e da pilocarpina (3 mg/kg, i.p. <b>B</b> ), bem como do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	61
<b>Figura 23:</b> Avaliação do efeito do ácido rosmarínico (0,3 - 3 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida por glutamato (20 µmol/pata) em camundongos.....	62
<b>Figura 24.</b> Efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (30 - 1000 mg/kg, v.o.) sobre a aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta (STM, A e C) e de longa duração (LTM, B e D), no modelo de esQUIVA inibitória em ratas.....	63
<b>Figura 25:</b> Efeito do MK 801 (0,01mg/kg, i.p.) sobre o efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na a memória de curta (STM, <b>A</b> ) e de longa duração (LTM, <b>B</b> ), no modelo de esQUIVA inibitória em ratas.....	64
<b>Figura 26:</b> Efeito da atropina (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na memória de curta (STM, <b>A</b> ) e de longa duração (LTM, <b>B</b> ), no modelo de esQUIVA inibitória em ratas.....	65

<b>Figura 27:</b> Efeito da mecamilamina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na memória de curta (STM, <b>A</b> ) e de longa duração (LTM, <b>B</b> ), no modelo de esquiva inibitória em ratas.....	65
<b>Figura 28:</b> Efeito do L-NAME (2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito do EE de <i>Melissa officinalis</i> (100 mg/kg, v.o.) na memória de curta (STM, <b>A</b> ) e de longa duração (LTM, <b>B</b> ), no modelo de esquiva inibitória em ratas.....	66
<b>Figura 29:</b> Esquema dos prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do EE de <i>Melissa officinalis</i> .....	80
<b>Figura 30:</b> Esquema dos prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade facilitatória da memória do EE de <i>Melissa officinalis</i> .....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais vias envolvidas na modulação do LTP.....	26
--	----

## RESUMO

O presente estudo analisou a possível ação antinociceptiva do extrato etanólico (EE) obtido da *Melissa officinalis* em modelos de nociceção química, mecânica e térmica em camundongos e ratos. O EE (3-1000 mg/kg) administrado pela via oral (v.o.), 1 h antes do teste, inibiu significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com  $DI_{50}$  de 241,92 mg/kg e inibição de  $52 \pm 5\%$ . Da mesma forma, o EE (30-1000 mg/kg, v.o.) inibiu significativamente a nociceção de origem neurogênica ( $33 \pm 7\%$ ) e inflamatória ( $48 \pm 5\%$ ) induzida pela formalina. O EE (30-1000 mg/kg, v.o.) também inibiu a nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, com  $DI_{50}$  de 198,54 mg/kg e inibição de  $62 \pm 5\%$ . Além disso, o ácido rosmarínico (0.3-3 mg/kg, v.o.), presente em grandes quantidades no EEMO, administrado 60 min antes do teste, também reduziu de forma dependente da dose a nociceção induzida pelo glutamato, com  $DI_{50}$  de 2.64 mg/kg e inibição de  $64 \pm 3\%$ . O EE (100 mg/kg, v.o.) causou marcante inibição da resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA, AMPA, Cainato, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (com inibições de  $68 \pm 5$ ,  $66 \pm 7$ ,  $85 \pm 2$ ,  $49 \pm 9$  e  $62 \pm 4\%$ , respectivamente), sem afetar a nociceção induzida por trans-ACPD e SP. Na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático, o EE (100 mg/kg) reduziu significativamente a alodínia mecânica, avaliada através de filamentos de Von Frey, com inibição de  $85 \pm 11\%$ . Este efeito foi mantido por até 12 horas, e parece não induzir tolerância e nem ter efeito cumulativo com o tratamento prolongado (15 dias). Além disso, o EE (3-300 mg/kg) foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica (com inibições de  $83 \pm 2$ ,  $83 \pm 2$  e  $54 \pm 12\%$ ) e

mecânica (com inibições de  $59\pm 10$ , 100 e 100%) induzida pela injeção intraplantar de BK,  $PGE_2$  e PMA, respectivamente. Igualmente, o EE (30-300 mg/kg) foi capaz de prevenir os efeitos deletérios da colite induzida por injeção retal de ácido acético com inibição de  $65\pm 8\%$  da inflamação e de  $48\pm 8\%$  do peso do cólon, sem afetar, no entanto, o peso do baço. A antinocicepção causada pelo EE (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção causada pelo glutamato foi significativamente atenuada pela injeção intraperitoneal (i.p.) de L-arginina (40 mg/kg), atropina (1 mg/kg) ou mecamilamina (2 mg/kg), mas não pela naloxona (1 mg/kg, i.p.). Além disso, o EE facilitou a aquisição e a retenção da memória de longa e curta duração, quando analisado no modelo da esQUIVA inibitória em ratos, facilitação esta revertida pelo pré-tratamento dos animais via i.p. com MK-801 (0,01 mg/kg), L-NAME (2 mg/kg), mecamilanima (5 mg/kg) e atropina (1 mg/kg). A antinocicepção ou facilitação da memória causada pelo EE não está associada a efeitos inespecíficos, como relaxamento muscular ou sedação. Em conjunto, estes resultados sugerem que o EE de *Melissa officinalis* apresenta importante atividade antinociceptiva em vários modelos experimentais de nocicepção e inflamação em camundongos e ratos, além de atividade facilitadora da memória em ratos no modelo da esQUIVA inibitória. O seu mecanismo de ação antinociceptiva e facilitadora da memória não está completamente esclarecido, mas o presente estudo mostrou que esta ação é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os sistemas glutamatérgico, colinérgico e com a via L-arginina-óxido nítrico.

## ABSTRACT

The present study investigated the possible antinociceptive actions of the ethanolic extract (EE) obtained from *Melissa officinalis* in chemical, mechanical and thermal behavioural models of pain in mice and rats. The EE (3-1000 mg/kg), given orally (p.o.), 1 h prior to testing, produced dose-dependent inhibition of acetic acid-induced visceral pain, with ID<sub>50</sub> of 241.92 mg/kg and inhibition of 52±5%. Moreover, the EE (30-1000 mg/kg, p.o.) also caused significant inhibition of both neurogenic (33±7%) and inflammatory (48±5%) pain of formalin-induced licking. In addition, the EE (30-1000 mg/kg, p.o.) caused significant and dose-dependent inhibition of glutamate-induced pain, with ID<sub>50</sub> of 198.54 mg/kg and inhibition of 62±5%. Furthermore, the rosmarinic acid (0.3-3 mg/kg), given p.o., 1 h prior to testing, also produced dose-related inhibition of glutamate-induced pain, with a mean ID<sub>50</sub> value of 2.64 mg/kg and inhibition of 64±3%. The EE (100 mg/kg, p.o., 1h prior to testing) caused marked inhibition of the nociceptive response induced by intrathecal (i.t.) administration of NMDA, AMPA, kainate, IL-1β and TNF-α (by 68±5, 66±7, 85±2, 49±9 e 62±4%, respectively), without affecting nociceptive responses induced by trans-ACPD and substance P. The EE (100 mg/kg, p.o.) also reduced the mechanical allodynia, evaluated by von Frey monofilament fibers, induced by partial sciatic nerve injury neuropathy during 10 h, with inhibition of 85±11%. In addition, the EE (3-300 mg/kg, p.o.) inhibited both mechanical (by 59±10, 100 and 100%) and thermal (by 83±2, 83±2 and 54±12%) hyperalgesia induced by BK, PGE<sub>2</sub> and PMA in the rat paw, respectively.

Moreover, the EE (30-300 mg/kg) inhibited both inflammation ( $65\pm 8\%$ ) and the weight of the colon ( $48\pm 8\%$ ) induced by the rectal injection of acetic acid, without affecting, however, the weight of spleen. The antinociception caused by EE (100 mg/kg, p.o.) at glutamate test was significantly attenuated by i.p. treatment of mice with L-arginine (40 mg/kg, i.p.), atropine (1 mg/kg, i.p.) or mecamlamine (2 mg/kg, i.p.). In contrast, EE (100 mg/kg, p.o.) antinociception was not affected by naloxone (1 mg/kg, i.p.).

Additionally, the EE improved memory processes in rats submitted to the inhibitory avoidance task. Although this response was blocked by i.p. treatment of rats with MK-801 (0.01 mg/kg), L-NAME (2 mg/kg), mecamlamine (5 mg/kg) and atropine (1 mg/kg). Furthermore, the antinociception and the improvement of the memory caused by EE were not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or sedation. Together, these results provide experimental evidences indicating that EE of *Melissa officinalis* produces dose-related antinociception and anti-inflammatory in several experimental models of nociception in mice and rats, as well as it was capable to improve the memory in inhibitory avoidance task. The mechanisms by which EE produced both effects still remains unclear, but at least in part, this effect seems to be modulation of the L-arginine-nitric oxide pathway, as well as glutamatergic and cholinergic systems.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produtos naturais

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam as sagradas escrituras e ao papiro de Ebers (1700 a.C.), em homenagem à quem o descobriu e publicou, Georg Ebers. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve uma grande variedade de fármacos de natureza animal, vegetal e mineral (OUBRÉ *et al.*, 1997; VANE & BOTTING, 1998; YUNES, PEDROSA & CECHINEL FILHO, 2001; LOMBARDINO & LOWE III, 2004).

Durante o período anterior à Era Cristã que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 a.C.), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas. Hipócrates foi quem primeiro registrou a utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina (documentos sumerianos de 5000 a.C. referem-se à papoula (*P. somniferum*)) (LOMBARDINO & LOWE III, 2004).

Em 1928, Friedrich Wohler revolucionou a ciência demonstrando que era possível obter matéria orgânica através de compostos inorgânicos (síntese da uréia). Esse grande passo na história da ciência não só possibilitou corrigir conhecimentos da época, os quais relatavam que a matéria orgânica só poderia ser obtida de animais e vegetais, como também foi um grande

impulso na ciência farmacêutica moderna. Tal descoberta possibilitou a produção de produtos sintéticos através de novas técnicas que viabilizaram a alteração da estrutura química de compostos, tendo como matéria prima substâncias de origem animal ou vegetal. A partir de então o conhecimento popular foi de extrema importância para que vários medicamentos industrializados chegassem ao mercado farmacêutico e alguns destes são utilizados atualmente em larga escala em todo o mundo. Um bom exemplo é o ácido acetil-salicílico (AAS), que surgiu a partir de um princípio ativo extraído da casca do salgueiro (*Salix alba*), utilizada popularmente para combater a febre e o reumatismo (KAUFFMAN & CHOOLJIAN, 2000; LOMBARDINO & LOWE III, 2004; KNOX, 2002).

Dessa forma, o uso de plantas, tornou-se importante na área das ciências farmacêuticas buscando o crescimento e aperfeiçoamento de métodos e recursos humanos especializados na busca de novas drogas eficientes. Atualmente, mais de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são obtidos de espécies vegetais isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal. Até a década de 70 as grandes indústrias farmacêuticas não tinham qualquer projeto de pesquisa na área de produtos naturais. Atualmente pelo menos metade das 250 maiores companhias farmacêuticas do mundo financiam programas de pesquisa na área de produtos naturais (YUNES & CALIXTO, 2001; PINTO, 2002).

Com relação aos produtos naturais, o Brasil é o país com maior número de espécies de plantas do mundo. Dos diversos ecossistemas brasileiros (pantanal, floresta amazônica, caatinga, cerrado, mata atlântica, mata de

restinga, manguezal e pampa) estima-se que o país possua aproximadamente 25% dentre as 350 mil presentes no mundo, fornecendo um potencial imenso para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (SIMÕES *et al.*, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001; PINTO, 2002).

As duas principais vias para identificação de produtos naturais visando a formulação de novos medicamentos são: o conhecimento de práticas tradicionais, ou etnofarmacologia e, a triagem aleatória de plantas (SIMÕES *et al.*, 2000; PINTO, 2002). A abordagem ao estudo de produtos naturais a partir de seu emprego por tribos indígenas, populações rurais tradicionais, caboclos e os descendentes de origem africana fornecem informações muito úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos, propiciando uma grande economia de tempo e dinheiro. Essa abordagem etnofarmacológica permite planejar a pesquisa de novos fármacos a partir de um conhecimento empírico existente. No entanto, para o desenvolvimento de um novo produto farmacêutico é necessária a integração de diversas áreas do conhecimento, entre elas podemos citar a fitoquímica, a botânica, a farmacologia, a agronomia, entre outras (SIMÕES *et al.*, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001).

Nos últimos anos, têm aumentado exponencialmente o interesse por terapias alternativas e o uso de produtos naturais derivados de plantas pela população. Isto se justifica porque grande parte da população acredita que os fitoterápicos apresentam menor número de efeitos colaterais do que os medicamentos sintéticos, o que nem sempre é verdade do ponto de vista científico, e por se mostrarem aparentemente eficazes em casos nos quais a

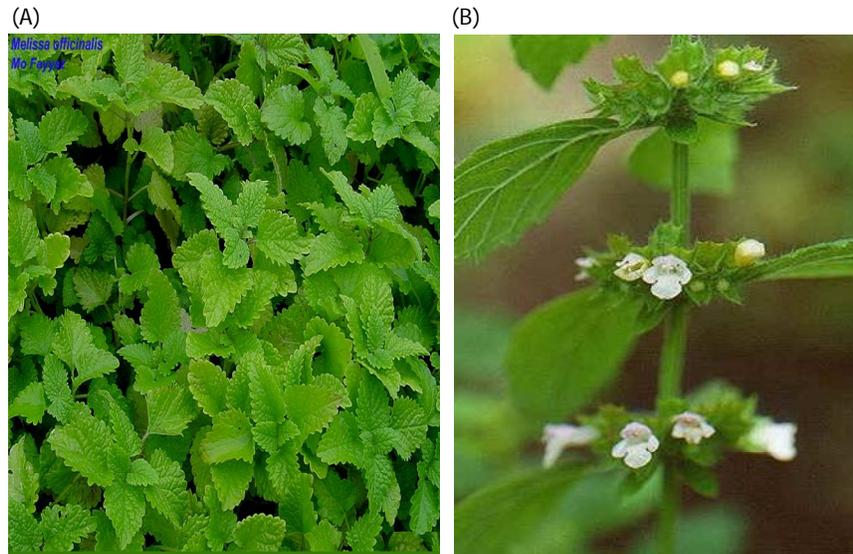
medicina tradicional ainda não alcançou o resultado esperado (CALIXTO, 2000).

Para os países em desenvolvimento, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros, facilitando o crescimento da fitomedicina nacional e desta forma, apresentando impacto na economia local (ELIZABETSKY & COSTA-CAMPOS, 1996).

### **1.2. *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis***

O nome latino “Melissa”, que significa bálsamo, tem raízes na palavra grega “meliteia”, de “meli, melitus”, ou seja, que vem do mel, e se refere à grande atração que esta planta exerce sobre as abelhas. O termo “officinalis” foi usado pela primeira vez na época de Linnaeus, e foi mencionado inicialmente pela farmacopéia francesa em 1733. “Officine” do francês significa “apotecário, laboratório” (HERODEZ *et al.*, 2003). No Brasil existem inúmeros nomes populares referentes à *Melissa officinalis*, tais como cidreira, melissa e bálsamo, este último derivado do nome popular na língua inglesa “lemon balm”. Trata-se de um arbusto perene, pertencente à família Lamiaceae, de aproximadamente um metro de altura (Figura 1), que tem origem na região do Mediterrâneo, leste da Ásia, sudeste da Sibéria e Norte da África, mas que se difundiu por todo o mundo, com boa adaptação. Sabe-se também que existem duas subespécies, a *officinalis*, que tem um cheiro característico de limão, e a subespécie *altissima*, que apresenta um odor

fétido característico (CARNAT *et al.*, 1998; HERODEZ *et al.*, 2003; DASTMALCHI *et al.*, 2007).



**Figura 1:** Folhas (A) e flores (B) da *Melissa officinalis*.

Autoridades médicas das civilizações grega e romana já prescreviam o uso tópico de *Melissa officinalis* para o tratamento de feridas (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2004). Entretanto, o primeiro relato escrito do uso medicinal desta planta remonta de aproximadamente 80 a.C. do livro *Matéria Médica*. Durante a Idade Média a utilização da *Melissa officinalis* ganhou força. Paracelsus (1493 - 1541) escreveu certa vez que esta planta poderia revivificar completamente um homem e curar todas as desordens do sistema nervoso. No século XV são também descritos os primeiros relatos do uso da *Melissa officinalis* como facilitador da memória (KENNEDY *et al.*, 2003).

Esta planta é conhecida por seus múltiplos usos populares, entre as afecções tratadas têm-se: dores de cabeça, enxaqueca, dores de dente, dores de ouvido, flatulência, indigestão, cólica, náuseas, nervosismo, anemia,

vertigens, síncope, asma, bronquite, amenorréia, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, arritmias, insônia, epilepsia, depressão, psicose, histeria, desordens estomacais, úlceras, feridas, reumatismos e torcicolos (CARNAT *et al.*, 1998; HERODEZ *et al.*, 2003; SALAH & JÄGER, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

Os efeitos cientificamente comprovados são: antioxidante (CARNAT *et al.*, 1998; RIBEIRO, BERNARDO GIL & ESQUÍVEL, 2001), sedativo (KENNEDY *et al.*, 2003; MÜLLER & KLEMENT, 2006), antiinflamatório intestinal, hepatoprotetor, digestivo (SIMMEN *et al.*, 2006; SCHEMANN *et al.*, 2006), antibacteriano, antifúngico, antiviral (especialmente contra o *Herpes simplex*), anti-histamínico (CARNAT *et al.*, 1998; SANDRAEI *et al.*, 2003; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2004), redutor da motilidade gastrointestinal, redutor do colesterol (BOLKENT *et al.*, 2005), redutor do estresse e da agitação (SANTOS-NETO *et al.*, 2006) e eficácia no controle da demência em casos leves a moderados de Alzheimer (AKLHODZADEH *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2006).

Entre os inúmeros compostos que foram isolados a partir do extrato de *Melissa officinalis*, os mais importantes são os compostos polifenólicos (ácido rosmarínico e ácido cafeico), óleos essenciais (cital), aldeídos monoterpênóides, sesquiterpenos, flavonóides (luteolina) e taninos (CARNAT *et al.*, 1998; HEITZ *et al.*, 2000; KENNEDY *et al.*, 2003; ZIAKOVÁ *et al.*, 2003; GAZOLA *et al.*, 2004; BOLKENT *et al.*, 2005; SALAH & JÄGER, 2005; DASTMALCHI *et al.*, 2007).

O ácido rosmarínico é o composto majoritário presente no extrato etanólico de *Melissa officinalis*, estima-se que esteja presente em uma

concentração de 2-5 % (CARNAT et al., 1998). Dessa substância já se têm conhecimento da atividade antiviral e antioxidante. Recente estudo de Iuvone e colaboradores (2006) demonstrou que o ácido rosmarínico é também capaz de proteger células PC12 da neurotoxicidade promovida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide, em estudos *in vitro*. No entanto, foi verificado que o ácido rosmarínico, nas doses de 1, 2, 4 e 8 mg/kg não exerce qualquer efeito sobre a memória de ratos no modelo da esQUIVA inibitória (PEREIRA et al., 2005).

Sabe-se que, ao menos parte das ações da planta ocorre devido às suas já comprovadas atividades sobre o sistema colinérgico. Dados obtidos por Perry e colaboradores (1996), Wake e colaboradores (2000) e depois confirmados por Kennedy e colaboradores (2003) deixam claro que o extrato tem forte ação ativadora sobre os receptores nicotínicos e muscarínicos do SNC, além de uma fraca atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase.

Em conjunto esses resultados sugerem que o extrato etanólico de *Melissa officinalis* pode exercer efeitos sobre a nocicepção - visto o grande envolvimento do sistema colinérgico com a atividade do extrato - e sobre a memória, uma vez que o sistema colinérgico está presente na formação de memória.

### **1.3. Dor**

O corpo humano possui inúmeros mecanismos de controle da homeostasia, entre eles a dor, que exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar acerca de possíveis ameaças ao bem estar e a integridade do organismo, e reter nossa atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada (CHAPMAN & GAVRIN, 1999; WALL,

1999). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (MILLAN, 1999; WOLF, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, podemos defini-la como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER & MELZACK, 1999). No entanto, assim como a beleza não é somente inerente a sua imagem visual, mas depende grandemente de seu observador, também a dor é uma experiência complexa que não envolve somente a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas principalmente seu processamento cognitivo e emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS & BASBAUM, 2001). A partir desta definição, pode-se citar um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional, e a junção de ambos é o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, em animais avalia-se a dor de forma indireta. Uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional, avalia-se somente o componente fisiológico, ao qual denomina-se nocicepção (TJØLSEN & HOLE, 1997). A função de alerta da dor reflete a ativação física de sensores denominados nociceptores, os quais são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excedem uma determinada faixa considerada fisiológica (estímulo inócuo) (BURGESS & PER, 1967; MILLAN, 1999).

Aproximadamente um século atrás, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de gerar dano tecidual. De acordo com esse modelo, os nociceptores

têm limiares característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais. Eles estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Fig. 2). Existem ainda os nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que compreendem uma pequena proporção das fibras aferentes, que normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resulta na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, SP, NO, opióides e acetilcolina, entre outros (JULIUS & BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006). Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a uma propagação do sinal nociceptivo graças a um aumento na permeabilidade da membrana neuronal à cátiões e conseqüente geração do potencial de ação (CARLTON & COGGESHALL, 1998; PASERO *et al.*, 1999; RAJA *et al.*, 1999;). É importante ressaltar que estes mediadores podem ser liberados não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por fibras simpáticas e por células não neuronais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e células inflamatórias (BESSON, 1997).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por meio das fibras aferentes até o SNC. Os longos axônios das fibras nociceptivas, que se localizam em nervos periféricos, estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos concomitantemente à medula espinhal e aos tecidos corporais (MILLAN, 1999). As fibras aferentes primárias são classificadas de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Fig. 2). Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam maior velocidade de condução são as fibras AB. Essas fibras respondem ao leve toque ou movimento e são importantes para informar a posição do corpo no espaço (propriocepção), elas são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e em condições fisiológicas não contribuem para a sensação dolorosa. Entretanto, a estimulação desse tipo de fibra pode aliviar a sensação dolorosa, como ocorre quando ativadas por fricção da pele após alguma lesão. No entanto, ainda existem dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da nocicepção da periferia à medula espinhal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem fibras C não mielinizadas e fibras pouco mielinizadas Aδ. Estas fibras são responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (PLEUVRY, 1996; SHELLEY & CROSS, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001).

Tipo de fibra	 Aα e Aβ	 Aδ (I e II)	 C
<b>Mielinização</b>	Muita	Pouca	Ausente
<b>Diâmetro</b>	10µm	2 - 6µm	0.4 - 1.2µm
<b>Velocidade de condução</b>	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
<b>Temperatura</b>	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
<b>Tipo de sinal</b>	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

**Figura 2:** Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius & Basbaum, 2001.

Todas as fibras nociceptivas sensoriais primárias fazem conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos superiores, que através de neurônios terciários enviam informação ao córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004). Os principais tratos que carregam a informação nociceptiva da medula para o encéfalo são o espinotalâmico, espinorreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG & DOSTROVSKY, 2000).

Nesse sentido, o organismo também possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, pois após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático,

substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo. Um circuito modulador endógeno descendente conectando a substância cinzenta periaquedutal e o corno dorsal da medula é responsável pela ativação de conexões que promovem facilitação ou inibição da nocicepção. Entretanto, esse sistema não age simplesmente facilitando ou inibindo, uma vez que cada lesão induz um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema, exercendo este controle principalmente nas dores crônicas. Os sistemas de neurotransmissão mais estudados nesta conexão são: glutamatérgico, GABAérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioidérgico e adrenérgico, entre outros (MILLAN, 2002; REN & DUBNER, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

Sabe-se que os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato, que é encontrado nas fibras C, apresentam um papel fundamental na transmissão da informação nociceptiva da medula espinhal até os centros superiores (MILLAN, 1999; BLEAKMAN *et al.*, 2006). O glutamato exerce suas ações através de dois grupos distintos de receptores, um formado por receptores acoplados a canais iônicos, chamados ionotrópicos e outro formado por receptores acoplados à proteína G, denominados metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos compreendem os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), que são canais iônicos permeáveis ao cálcio, sódio e potássio (DICKESON, 1997). Dados demonstram que os receptores NMDA são formados por diferentes subunidades e estão amplamente distribuídos no SNC (MARVIZON *et al.*, 2002; BLEAKMAN *et al.*, 2006). Os receptores do tipo cainato, assim como os NMDA, encontram-se amplamente

distribuídos no SNC, incluindo corno dorsal da medula, principalmente nas fibras de pequeno e médio calibre, podendo modular a liberação de GABA em neurônios inibitórios (PALECEK *et al.*, 2004; BLEAKMAN *et al.*, 2006). Já o receptor AMPA é o primeiro a ser ativado em qualquer fenda sináptica frente à liberação de glutamato, decorrendo dele a ativação de outros receptores, como, por exemplo, o NMDA, que só se torna ativo após a ativação de AMPA, que promove a remoção do íon magnésio que obstrui seu poro (MILLAN, 2001). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos ( $m$ GluR) dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com sua homologia e mecanismo de transdução de sinal: o grupo I ( $m$ GluR 1 e 5) promove ativação da via da fosfolipase C, o grupo II ( $m$ GluR 2 e 3) e o grupo III ( $m$ GluR 4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente à adenilato ciclase (OZAWA *et al.*, 1998; GURPREET & STEPHEN, 2006).

Outro mediador nociceptivo é o óxido nítrico (NO), um importante mensageiro biológico que é sintetizado a partir da L-arginina pela sintase do óxido nítrico (NOS). Existem três isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), sendo as duas primeiras constitutivas e a terceira induzível por diversas formas de estímulos (principalmente inflamatórios) e capaz de produzir quantidades maiores de NO quando comparada às demais isoformas. Contrariamente às NOS constitutivas, a iNOS não depende do influxo intracelular de cálcio. O NO exerce seus efeitos intracelulares por ativar a guanilato ciclase solúvel, que por sua vez converterá GTP em GMPc, e este como segundo mensageiro poderá ativar PKG, canais iônicos e fosfodiesterases. Ozek e colaboradores (2003) relatam que o NO é produzido pós-sinápticamente à ativação de aminoácidos

excitatórios, e que inibidores da NOS são capazes de inibir indiretamente receptores NMDA. Além disso, tem-se relatado regulação recíproca entre NO e glutamato, uma vez que a nNOS é estimulada pela ativação de receptores NMDA que permitem o influxo de cálcio (MOORE *et al.*, 1991; GARTHWAITE & BOULTON, 1995).

Outro sistema envolvido na inibição da nocicepção é o opióide, ele age por duas vias principais, central e periférica. Na via central os agonistas opióides, endógenos ou não, atuam sobre a substância cinzenta periaquedutal, bulbo rostroventromedial e corno dorsal da medula espinhal, ativando a via de controle descendente da dor, em parte, por ativar os canais de potássio e inibir canais de cálcio dependentes de voltagem (MILLAN, 1999). Periféricamente, tem se proposto que agonistas  $\mu$  - opióides inibem a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários, enquanto agonistas de receptores  $\delta$  e  $\kappa$  opióides inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (KIM *et al.*, 2006).

Pode-se citar ainda outro sistema, o sistema colinérgico, visto que está bem estabelecido que agonistas colinérgicos e inibidores da acetilcolinesterase, os chamados colinomiméticos, são eficazes em causar antinocicepção em diversos modelos animais, o que sugere potencial terapêutico para esses fármacos. Essas substâncias agiriam sobre receptores nicotínicos (canais iônicos) e muscarínicos (acoplados a proteína G), os quais podem exercer ação central por ativar a substância cinzenta periaquedutal, e assim ativar a via de controle descendente da dor. Tanto na periferia, quanto no SNC sabe-se também que agonistas colinérgicos são capazes de estimular a

secreção de GABA, e desta forma promover antinocicepção (JONES & DUNLOP, 2007).

Dentre os transtornos que comumente acometem pacientes que apresentam dor associada a quadros de hipersensibilidade (hipernocicepção) estão a hiperalgesia (resposta nociceptiva aumentada à estímulos nocivos) e a alodínia (resposta nociceptiva à estímulos inócuos) (MILLAN, 1999). As quais podem ser causadas por anormalidades nestes sistemas de neurotransmissores acima citados.

Em termos de duração, a sensação dolorosa pode ser transitória, aguda ou crônica. Quando transitória, a ativação de nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual. Em contrapartida, na dor aguda geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado. Por sua vez, a dor crônica, na maioria das vezes, é gerada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não os causadores (LOESER & MELZACK, 1999; WOOLF & MANNION, 1999; ZIMERMANN, 2001; MENDELL & SAHENK, 2003).

Quanto à sua origem, a dor pode ser classificada em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória. A dor nociceptiva deve-se à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos. A dor neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC. Quando há disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos, resultando em quadro álgico, denomina-se dor neuropática. No entanto, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, diz-se dor psicogênica (MILLAN, 1999). Por fim, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias,

geralmente ocorre quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos, produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997).

### **1.3.1. Dor inflamatória**

Quando ocorre lesão tecidual em nosso organismo, são acionados mecanismos de controle com o propósito de limitar os danos e auxiliar a regeneração. Estes mecanismos fazem parte da resposta inflamatória, caracterizada por quatro sinais cardinais: dor, rubor, calor, edema e, em alguns casos, culminando com perda de função (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A inflamação envolve a participação de diversos sistemas, mediadores e células especializadas. Entre os principais sistemas estão o sistema do complemento, de coagulação e o sistema cinina-callicreína. Dentre as células envolvidas podem ser citadas as células do sistema imune, como linfócitos e mastócitos, e principalmente os macrófagos, que estão envolvidos na liberação de uma gama de mediadores e radicais livres que contribuirão para o processo inflamatório (HAVSTEEN, 2002). Entre estes mediadores liberados pelos macrófagos merecem destaque as citocinas, que entre outras ações induzem a liberação de enzimas envolvidas no processo inflamatório, tais como as COXs (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

A formação de prostanóides pelas COXs é um dos responsáveis pela sensação de dor (MASFERRER *et al.*, 1994). Além das prostaglandinas, outros mediadores inflamatórios contribuem para a transmissão da nocicepção, bem como para a inflamação e o processo de recuperação. Dentre eles pode-se

citar: histamina, serotonina, cininas, citocinas, neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, prótons, neurotrofinas, ATP, NO e opióides, entre outros; oriundos do sangue, de células do tecido lesado, células adjacentes ou de células inflamatórias (JULIUS & BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006).

No entanto, em alguns casos, o processo inflamatório deixa de ser uma defesa benéfica e passa a ser um processo patológico. Isso decorre de alterações fisiológicas que começam pela lesão inicial, mas que resultam em eventos que perpetuam o quadro inflamatório, quando o estímulo é persistente. Nestas condições, a inflamação perde sua característica de proteção e torna-se doença. A grande preocupação na busca dos mecanismos que envolvem a inflamação é devido ao seu envolvimento em doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e reumatológicas (GARCIA , 2005).

### **1.3.2. Dor neuropática**

Diferentemente da dor aguda, a dor neuropática não tem função biológica protetora. Mais que um sintoma, a dor neuropática é a própria doença, pois a sensação de dor é incapacitante e interminável, podendo durar inclusive por décadas após a lesão inicial. Pode ser iniciada por múltiplos fatores, tais como: dieta inadequada (excesso ou falta de vitamina B<sub>12</sub>, por exemplo), diabetes mellitus (tipo I ou tipo II), inflamações crônicas, quadros infecciosos (como na neuralgia pós herpética), amputações, compressões nervosas, alterações no sistema nervoso autônomo, entre outras. Desta forma, a dor neuropática foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da

Dor como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso” (ZIMMERMANN, 2001; MENDELL & SAHENK, 2003).

Os principais sintomas clínicos são: hiperalgesia, alodínia e paradoxalmente falta de sensibilidade na área afetada. Devido, principalmente, às alterações ocorridas na medula espinhal (CODERRE *et al.*, 1993; JI & WOOLF, 2001).

Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não são inteiramente compreendidos. Contudo, sugere-se que o desenvolvimento da dor crônica após lesão do nervo ocorra através de alterações na medula espinhal, como excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e eventualmente, mudança no fenótipo. Essas mudanças ocorrem principalmente devido a uma estimulação excessiva dos nociceptores, uma vez que eles estão com um limiar de ativação mais baixo (MacFARLANE *et al.*, 1997; COUTAUX *et al.*, 2005).

A excitabilidade aumentada ocorre em função de despolarizações repetitivas das fibras não mielinizadas do tipo C, o que resulta de prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Esse fenômeno é conhecido como “Wind up” (DAVIES & LODGE, 1987; HERRERO *et al.*, 2000) e significa um aumento progressivo no número de potenciais de ação por um estímulo que ocorre em neurônios do corno dorsal. Esses episódios repetitivos de “wind up” podem levar a potenciação a longo prazo (long term potentiation, LTP), a qual envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica (POCKETT, 1995). Esses fenômenos irão induzir inúmeras alterações em receptores (principalmente os de glutamato e taquicininas) e segundos mensageiros

celulares (cuja principal envolvida é a PKC) (OTSUKA & YOSHIOKA, 1993; HERRERO *et al.*, 2000).

Quanto à diminuição da neurotransmissão inibitória como mecanismo etiológico da dor neuropática, sabe-se que está associada principalmente, a anormalidades na neurotransmissão GABAérgica e a redução da eficácia dos opióides endógenos (ZHANG *et al.*, 1998; WOOLF, 2004).

Além dos mecanismos acima descritos, outros que merecem ser citados são: inibição de transcrição e liberação de citocinas, sintase do óxido nítrico e enzimas envolvidas na síntese das prostaglandinas, além da expansão das fibras A $\beta$ , que invadem a lâmina II do corno dorsal da medula, tornando essas fibras pró-nociceptivas (RAMER *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 2002).

O manejo clínico da dor neuropática é complexo, uma vez que ela se mostra refratária à maioria dos medicamentos analgésicos em uso. A terapia utilizada atualmente consta de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção da serotonina, anticonvulsivantes e capsaicina de uso tópico, entre outros (SAWYMOK, 2003; UEDA, 2006). Desta maneira, fazem-se necessárias pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta condição patológica.

#### **1.4. Memória**

Memória é a capacidade de reter, recuperar, armazenar e evocar informações disponíveis no sistema nervoso central, desta forma podemos dizer que é a retenção da informação aprendida (KANDELL, SCHWARTZ &

JESSELL, 2000; BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002). A palavra memória deriva do latim e significa período alcançado pela lembrança.

Na Grécia antiga (século VIII a.C.) Hesíodo declarou que a memória era a fonte de todas as artes, a Musa das Musas. Mais à frente, já no século IV a.C. Sócrates compara a formação da memória às impressões em blocos de cera, e seu discípulo, Aristóteles, ressalta a importância da memória e sua relação com os processos de aprendizado. O primeiro a tentar localizar a memória no cérebro foi Galeno (200 d.C.), que postulou que o quarto ventrículo era associado ao ato de recordar enquanto o terceiro ventrículo estava relacionado ao aprendizado. Descartes, no século XVI ainda defendia a localização de sítios específicos que continham a memória (ZIGMOND *et al.*, 1999; KANDELL, SCHWARTZ & JESSELL, 2000).

Em 1894, Santiago Ramón y Cajal postulou em um de seus livros que a memória deveria ser formada pelo reforço de conexões entre os neurônios já existentes, que aumentavam a efetividade de sua comunicação, uma vez que percebeu que o número de neurônios de um cérebro adulto não variava com o tempo (KANDELL, SCHWARTZ & JESSELL, 2000).

Na década de 1940 um discípulo de Charles Sherrington, chamado Wilder Penfield, conseguiu através de estimulação elétrica em pacientes submetidos à neurocirurgia para tratamento de epilepsia, identificar regiões que quando estimuladas davam origem ao que ele chamou de resposta experiencial, onde o paciente descrevia uma lembrança correspondente a uma experiência vivida (SANTI & GRODZINSKI, 2007).

Em 1949, Donald Hebb dividiu a memória em memória de curta duração e de longa duração, sendo uma dependente de circuitos reverberativos e outra de mudanças estruturais (COOPER, 2005).

Hoje se sabe que são inúmeras estruturas cerebrais relacionadas à memória, e não há um lócus único envolvido na aquisição, armazenamento e evocação das diversas informações adquiridas por aprendizagem, tais como: hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, giro parahipocampal, fórnix, corpos mamilares, giro do cíngulo, entre outros (KANDELL, SCHWARTZ & JESSELL, 2000; BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002).

De maneira simplificada, a memória pode ser classificada em Declarativa e não Declarativa. A memória declarativa está relacionada à lembrança de fatos e eventos e à habilidade de verbalizá-los; está anatomicamente relacionada ao lobo temporal medial e ao diencéfalo. Já a memória não declarativa está relacionada a respostas emocionais e memórias de procedimentos e relaciona-se ao núcleo estriado, ao cerebelo e à amígdala (KANDELL, SCHWARTZ & JESSELL, 2000; BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002).

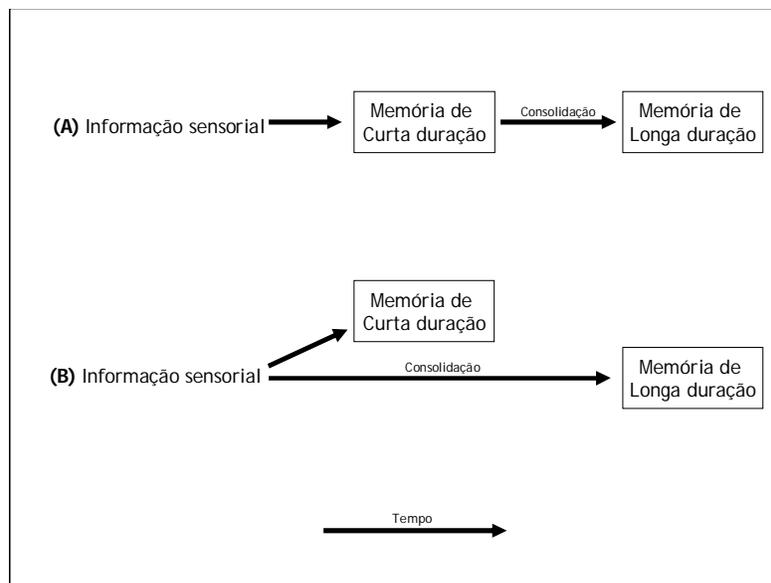
A memória declarativa pode ser classificada em:

- Memória imediata ou de trabalho: dura no máximo alguns segundos e é usada para fatos que são esquecidos completamente, é resultante de um influxo de íons potássio. Um exemplo é a capacidade de repetir imediatamente um número de telefone que é dito e esquecer logo em seguida. A qual é dependente do córtex pré-frontal.
- Memória de curto prazo: tem duração de até algumas horas. Neste caso, há mudanças estruturais em proteínas pré-existentes. Um

exemplo deste tipo de memória é a capacidade de se recordar do cardápio do almoço do dia anterior.

- Memória de longo prazo: dura de meses a anos e para sua formação exige a síntese de novas proteínas e translocações nas já existentes. Um exemplo é o aprendizado de uma nova língua.

A formação da memória de longo prazo pode passar ou não pelo estágio de memória de curto prazo, como é o caso de memórias da infância. Por outro lado, não necessariamente toda memória de curto prazo irá tornar-se uma memória de longo prazo, por exemplo, é fácil lembrar qual o cardápio do jantar do dia anterior, mas dificilmente alguém lembrará do cardápio do jantar de uma semana atrás (Figura 3). À conversão de uma informação em memória de longa duração dá-se o nome de consolidação (BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002; IZQUIERDO *et al.*, 2002; CAMMAROTA *et al.*, 2004b).



**Figura 3:** A informação sensorial pode ser armazenada temporariamente como memória de curta duração, mas a armazenagem permanente depende de consolidação. **(A)** A informação pode ser consolidada a partir da memória de curta duração. **(B)** Alternativamente, o processamento da informação necessária para a consolidação pode ocorrer separadamente da memória de curto prazo. Adaptado de BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002.

Pouco se sabia, no entanto, sobre os mecanismos moleculares envolvidos na memória até que Eric Kandell, em 1965, publicou seus estudos com a *Aplysia californica* e os mecanismos de potenciação pós-sináptica. No entanto, a descoberta do que viria a ser colocado como o principal mecanismo molecular da memória é conferida a Terje Lømo, que em 1966 publicou um estudo mostrando a potenciação pós-sináptica, chamada por ele de potenciação a longo prazo (LTP), em hipocampus de mamíferos (coelhos) (BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002; LØMO, 2003).

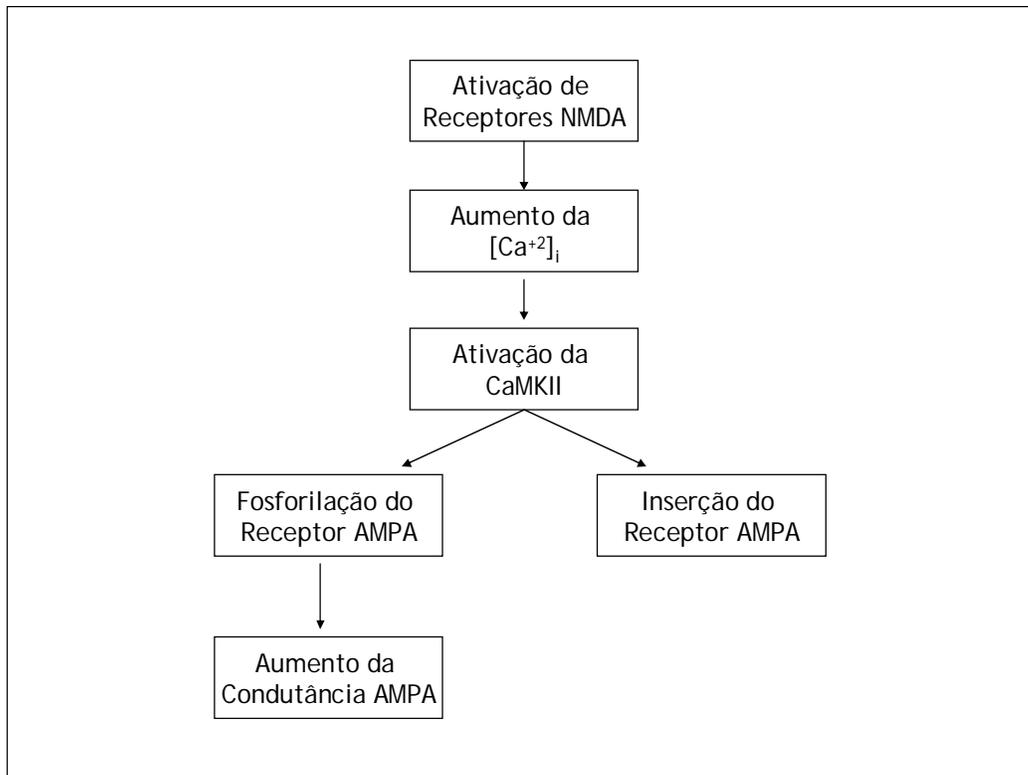
O LTP é um aumento da força de sinapses químicas que pode durar de minutos até anos, sendo simplesmente o resultado de uma série de pequenos estímulos elétricos de alta frequência. Sua ocorrência contribui para a plasticidade sináptica, provendo bases para um sistema nervoso altamente adaptável, fundamental para o aprendizado e a memória (JI *et al.*, 2003; HAWKINS, KANDELL & BAILEY, 2006; WANG, HU & TSIEN, 2006).

As quatro propriedades fundamentais do LTP são: indução rápida, especificidade, associabilidade e cooperatividade. Sua indução é rápida, pois pode ser iniciado por um ou mais breves estímulos tetanizantes em uma célula pré-sináptica. Específica porque uma vez induzido em uma sinapse o LTP não é arbitrariamente conduzido a outras sinapses adjacentes. A associabilidade refere-se à observação de que a estimulação fraca de uma única via é insuficiente para gerar LTP, no entanto, a estimulação simultânea e forte de outra via pode gerar LTP em ambas. E por fim a cooperatividade que refere-se à capacidade dos neurônios pós-sinápticos de gerarem LTP frente à estimulação fraca, sem efeito *per se*, de inúmeras vias que convergem para ele (WANG, HU & TSIEN, 2006).

O mecanismo se dá principalmente pela via glutamatérgica. Uma vez que o estímulo tetanizante faz com que o glutamato seja liberado na fenda sináptica, ativando primeiramente os receptores AMPA. A despolarização dos receptores AMPA expulsa o  $Mg^{+2}$  do poro do canal NMDA, este por sua vez permite a entrada de grandes quantidades de  $Ca^{+2}$ , o aumento da concentração intracelular de  $Ca^{+2}$  ativará inúmeras quinases (além da NOS). A ativação dessas quinases levará a fosforilação de alguns receptores AMPA citoplasmáticos que se externalizam, aumentando ainda mais a resposta ao glutamato liberado na fenda (HAWKINS, KANDELL & BAILEY, 2006; WANG, HU & TSIEN, 2006).

Para fins didáticos os mecanismos que envolvem os LTP podem ser divididos em LTP precoce e LTP tardio (SWEATT, 1999), ou ainda, segundo uma minoria, em LTP-1, LTP-2 e LTP-3 (RAYMOND, 2007).

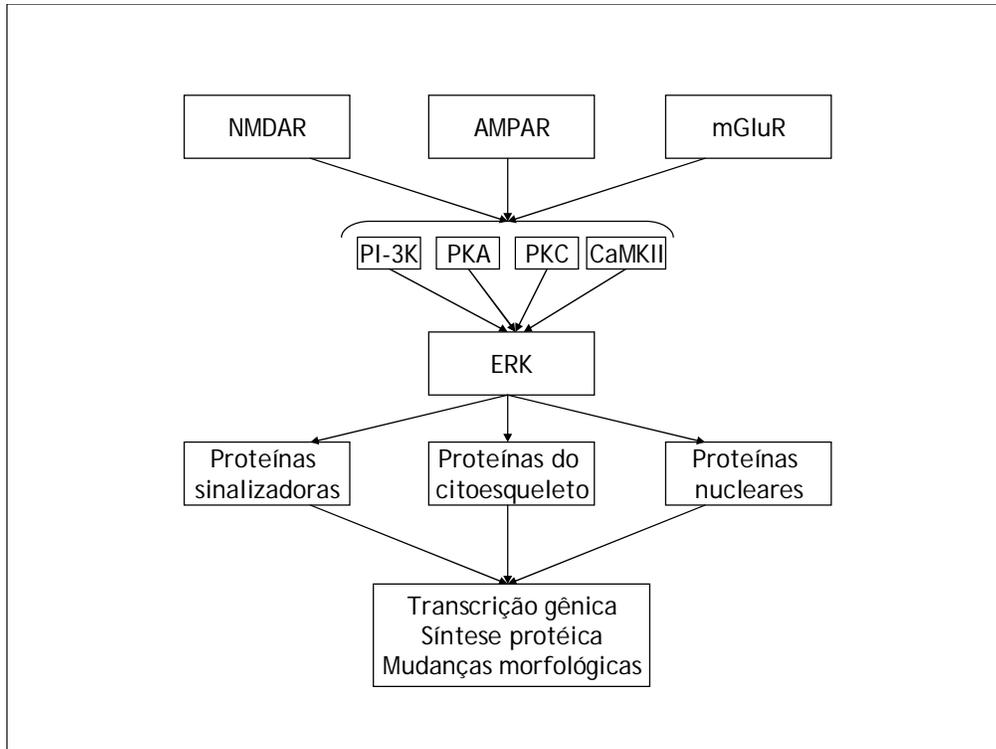
Segundo Sweatt (1999) a fase precoce é dependente de NMDA e independente de síntese protéica (Figura 4), porém marcada por grande atividade de proteínas quinases, como proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) e proteína quinase A (PKA). Essas quinases devem fosforilar proteínas já existentes na célula, alterando o seu estado funcional.



**Figura 4:** A fase precoce do LTP independe de síntese de proteínas. Adaptado de LYNCH, 2004. Abreviaturas:  $[Ca^{+2}]_i$  - concentração intracelular de íons cálcio; CaMKII - cálcio-calmodulina quinase II.

A diferenciação para a fase tardia se dá pela presença de síntese protéica, com participação preponderante da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (LYNCH, 2004; WANG, HU & TSIEN, 2006).

O LTP-1 é equivalente à fase precoce, sem síntese de proteínas, desenvolvendo seu efeito somente através da translocação das proteínas existentes. O LTP-2 é uma fase intermediária da fase tardia que requer síntese protéica, mas é independente de transcrição gênica. E finalmente, o LTP-3 representa o componente mais duradouro da fase tardia e é marcado por transcrição gênica (RAYMOND, 2007).



**Figura 5:** Todas as fases do LTP se comunicam através da via da Quinase regulada por sinal extracelular(ERK). Adaptado de LYNCH, 2004. Abreviaturas: NMDAR - receptor NMDA; AMPAR - receptor AMPA; mGluR - receptor glutamatérgico metabotrópico; PI-3K - Fosfolipase- 3-quinase; PKA - Proteína quinase A; PKC - proteína quinase C; CaMKII - Cálcio-calmodulina quinase II.

Este sistema bastante complexo pode ser modulado por um grande número de enzimas e receptores, alguns dos mais importantes estão citados na Tabela 1:

**Tabela 1:** Principais vias envolvidas na modulação do LTP.

Modulador	Alvo
NOS (Síntase do óxido nítrico)	Guanilyl ciclase, PKG, NMDAR, Ryr
mGluR	Amplificação de PKC, MAPK
Receptores colinérgicos	Amplificação da CaMKII, $[Ca^{+2}]_i$

Adaptada a partir de dados obtidos de BORTOLOTTO *et al.*, 2005; EDWARDS & RICKARD, 2006; ODDO & LA FERLA, 2006; KIM *et al.*, 2007.

É sabido que a acetilcolina é um neurotransmissor central envolvido em muitas funções cognitivas, inclusive o aprendizado e a memória. Neurônios colinérgicos frequentemente inervam os terminais pré-sinápticos que modulam a atividade de vários sistemas no encéfalo. No hipocampo, por exemplo, liberação pré-sináptica de acetilcolina pode regular a atividade de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos. Conseqüentemente, perturbações do sistema colinérgico podem levar à disfunções em outros sistemas de neurotransmissores e nas funções por eles desempenhadas (GOLD, 2003; MIRANDA *et al.*, 2003).

Já é bem estabelecido que o NO tem um papel importante para a consolidação da memória. No entanto, até pouco tempo pensava-se que sua ação dava-se exclusivamente pela amplificação da guanilato ciclase no neurônio pré-sináptico, vital para a manutenção da potenciação à longo prazo. Porém alguns pesquisadores têm demonstrado que a ação do NO sobre os receptores de Rianodina e outros canais iônicos também tem fundamental importância sobre a memória (EDWARDS & RICKARD, 2007).

Sabe-se também que inúmeros fármacos analgésicos têm efeitos deletérios sobre a memória uma vez que antagonizam sistemas que estão envolvidos nos dois quadros, tais como os sistemas glutamatérgico e colinérgico, além de bloqueadores da via da L-arginina-Óxido Nítrico (BORTOLOTTO *et al.*, 2005; ODDO & LA FERLA, 2006; EDWARDS & RICKART, 2007). Desta forma, a pesquisa de novos agentes analgésicos que não afetem a memória torna-se imperativa, uma vez que muitos pacientes que fazem uso crônico de medicação analgésica são idosos e por isso tornam-se mais propensos a diversos tipos de demências, entre elas o Alzheimer.

A Doença de Alzheimer é uma demência que afeta grande parte da população acima de 85 anos, cujos principais sinais são emaranhados neurofibrilares e placas de deposição de peptídeo B- amilóide no sistema nervoso central além de intensa perda neuronal, principalmente de neurônios colinérgicos. Como resultado os principais sintomas são perda da memória recente e agitação psicomotora. O tratamento atualmente é feito à base de inibidores da acetilcolinesterase e da memantina (antagonista NMDA), porém, é pouco efetivo e apresenta muitos efeitos colaterais (BEERI *et al.*, 2005; ODDO & LA FERLA, 2006).

O EE de *Melissa officinalis* mostra-se um potencial fitoterápico para o tratamento para pessoas que apresentam Alzheimer, tendo em vista que inúmeros estudos demonstram sua ação sobre neurônios colinérgicos. Esta ação pode ter um efeito facilitador sobre a memória, além de seu já conhecido efeito sedativo que pode beneficiar os pacientes portadores desta doença por diminuir a agitação psicomotora. Além disso, seu provável efeito analgésico beneficiaria esta população que como já dito anteriormente, são pessoas que fazem grande uso deste tipo de medicação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação antinociceptiva, antiinflamatória e facilitadora da memória do extrato etanólico (EE) obtido de *Melissa officinalis* em modelos animais que utilizam estímulos químicos, térmico e mecânico em camundongos e ratos, assim como avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestas atividades. Uma vez que seria de grande valia um fármaco que facilite a memória e tenha ação antinociceptiva, uma vez que a maioria dos analgésicos em uso tem efeito inibitório sobre a memória, uma vez que, quase sempre, antagonizam o sistema glutamatérgico, em especial receptores NMDA.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* em modelos químicos de nocicepção induzida pelo glutamato, formalina e ácido acético em camundongos;
2. Analisar o possível efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre a hiperalgesia térmica e mecânica, em ratos, nos modelos descritos por Hargreaves e Randall e Sellito, respectivamente;
3. Avaliar o efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos;

4. Avaliar o efeito antiinflamatório do EE de *Melissa officinalis* sobre o modelo de colite induzida por ácido acético;
5. Avaliar o efeito antinociceptivo do ácido rosmarínico, presente em grande quantidade no EE de *Melissa officinalis*, sobre o modelo de nocicepção induzida pelo glutamato;
6. Investigar a influência dos sistemas: glutamatérgico, opióide, colinérgico e a via L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos;
7. Investigar a ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* sobre a nocicepção induzida por injeção i.t. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ;
8. Analisar o efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre a memória em ratos, no modelo de esquiva inibitória.
9. Investigar a influência dos sistemas: glutamatérgico, colinérgico e da via L-arginina-óxido nítrico na ação facilitadora da memória do EE de *Melissa officinalis* no modelo de esquiva inibitória.
10. Verificar o efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre o desempenho e atividade locomotora de camundongos e ratos no teste do campo aberto.

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados nos experimentos camundongos do tipo Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-35g e ratos Wistar de ambos os sexos pesando entre 250-300 g. Os animais foram aclimatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro as 7:00 h), com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e livre acesso à água e comida. Os camundongos (machos e fêmeas) foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo (n: 23080.0011700/2005-03/UFSC) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguindo as normas éticas para o cuidado dos animais de laboratório e investigação científica da dor em animais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

#### **3.2. Material botânico**

As folhas de *Melissa officinalis* foram cedidas pela Centroflora (Ourinhos, Brasil). O extrato etanólico foi preparado por maceração, usando etanol 95%. As folhas secas de *Melissa officinalis* foram separadas dos talos e deixadas para secar livremente ao sol. Após, as folhas foram cortadas em

pequenos pedaços e colocadas em um recipiente juntamente com etanol (95%) na quantidade suficiente para cobrir as folhas, a mistura foi tampada e mantida por 7 dias. Decorrido o período de maceração o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório até a secura, onde obteve-se o extrato etanólico que foi armazenado no refrigerador (4°C).

### 3.3. Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: formalina e cloridrato de morfina (Merck, Darmstadt, Alemanha); capsaicina, ácido glutâmico, cloridrato de naloxona, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), Interleucina-1B (IL-1B), Fator de necrose tumoral α (TNF-α), cloridrato de L-arginina, cloridrato de D-arginina, Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Bradicinina, Sulfato de atropina, Cloridrato de Pilocarpina, (5S,10R)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] (MK-801), ácido rosmarínico (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA); ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido caínico (cainato), (PMA) forbol 12-miristato 13-acetato, Hidrocloreto de nicotina, Cloridrato de Mecaminalamina (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA). O extrato etanólico foi obtido das folhas da *Melissa officinalis* no Departamento de Farmacologia da Universidade de Brasília (UnB), como descrito acima. As drogas foram dissolvidas em solução 0,9% de NaCl, com exceção da capsaicina, que foi dissolvida em 5% etanol, 10% tween 80 e 85% de salina e do EE de *Melissa officinalis* que foi dissolvido em 10% de tween 80 e 90% de salina. No entanto, a concentração final de etanol não excedeu 5%, não causando assim quaisquer efeitos "per se".

### 3.4. Nociceção induzida pelo ácido acético

Primeiramente verificou-se o efeito do EE de *Melissa officinalis* no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nociceção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER *et al.*, 1959; VINEGAR *et al.*, 1979; TJØLSEN & HOLE, 1997). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de 450 µl de ácido acético (0,6%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (KOSTER *et al.*, 1959; SANTOS *et al.*, 1999). Grupos de animais foram pré-tratados, pela via oral (v.o.), com EE de *Melissa officinalis* (10-1000 mg/kg) 60 min antes da realização dos experimentos; os grupos controles foram tratados com veículo (10 ml/kg). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais pré-tratados sistemicamente com EE de *Melissa officinalis*.

### 3.5. Nociceção induzida pelo glutamato

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nociceção e da antinociceção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL & NEECK, 2001). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de glutamato tamponado (20 µmol/pata) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, que foi observado por 15 min logo após a injeção. O tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nociceção. Os animais foram tratados com o EE de *Melissa officinalis* (10 - 1000 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) pela via oral (v.o.) 1 h antes da injeção de glutamato.

### 3.6. Nociceção induzida pela formalina

O modelo de nociceção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR & HOLE, 1987, TJØLSEN *et al.*, 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente a mesma descrita por Santos e Calixto (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado o tempo

que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina. Os animais receberam o EE de *Melissa officinalis* (30-1000 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) 1 h antes da administração da formalina.

### **3.7. Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático**

O possível efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre a dor neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral (7%, i.p.) e após a verificação de que se obteve o efeito anestésico, foi realizada incisão no membro inferior direito para a exposição do nervo ciático. O nervo em questão foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (SELTZER *et al.*, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG & BASBAUM, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi amarrado com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) sendo também utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond).

A dor neuropática foi avaliada do 7º ao 20º dia após a ligadura do nervo ciático com o filamento de Von Frey (0,6 g). O método consiste na aplicação do filamento sob a região plantar da pata que sofreu a constrição. A resposta nociceptiva foi expressa como a porcentagem de retirada da pata a 10 estímulos induzidos pelo filamento de Von Frey, com intervalos de 1 min entre cada aplicação. No 7º dia os animais foram avaliados 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h

após a administração do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), e nos dias subsequentes a avaliação foi realizada apenas 2, 10 e 24 h após o tratamento, sendo que entre o 15º e 17º dias todos os grupos receberam apenas veículo. Dois grupos de animais: um operado e outro que foi submetido ao procedimento cirúrgico, porém sem sofrer a constrição (grupo falso operado ou sham), receberam apenas veículo (10 mL/kg, v.o.) e foram utilizados como parâmetro de comparação ao grupo operado e tratado com o EE de *Melissa officinalis*.

### **3.8. Hiperalgisia induzida por mediadores inflamatórios.**

O possível efeito anti-hiperalgésico do EE foi avaliado usando o procedimento previamente descrito (RANDALL e SELITTO, 1957; HARGREAVES, 1998; OTUKI *et al.*, 2005). Os animais foram pré-tratados com EE de *Melissa officinalis* (3 - 300 mg/kg, v.o.), 60 min antes da injeção na pata direita de 0,1 ml de PGE<sub>2</sub> (10 nmol/pata), PMA (0,1 nmol/pata) ou BK (3 nmol/pata), somente veículo (10 ml/kg). A hiperalgisia foi avaliada 30 min após a administração dos agentes irritantes. Os animais tratados com BK foram pré-tratados subcutaneamente (s.c.) com um inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captropil (5 mg/kg), uma hora antes do experimento, para prevenir a sua degradação (MENDES *et al.*, 2000).

A resposta hiperalgésica induzida pelos agentes flogísticos foi avaliada pela aplicação crescente de pressão ou temperatura na superfície plantar da pata direita dos animais, conforme o método previamente descrito (RANDALL & SELITTO 1957; HARGREAVES *et al.*, 1998). A hiperalgisia mecânica foi

avaliada no aparelho de Randall e Selitto (Ugo Basile, Milan, Itália) no qual a pressão pode variar de 0 a 750 g. A resposta hiperalgésica foi analisada em função da capacidade do rato em suportar a pressão exercida pelo aparelho em sua pata. Já para a análise da hiperalgesia térmica, os animais foram ambientados no aparelho de Hargreaves (Ugo Basile, Milan, Itália), por aproximadamente 10 min antes dos experimentos. Foi avaliado o tempo que o animal permaneceu com a pata sobre uma fonte de calor radiante (radiação infravermelha). O tempo máximo estabelecido foi de 30 segundos para evitar assim, danos teciduais.

### **3.9. Indução de Colite por injeção intra-retal de ácido acético**

Um possível efeito êntero protetor do EE de *Melissa officinalis* foi avaliado pelo modelo da colite induzida pela injeção intra-retal de ácido acético descrito por Popov e colaboradores (2006). Os animais foram pré-tratados com EE de *Melissa officinalis* (30,100 e 300 mg/kg, v.o.), veículo (10 ml/kg, v.o.) ou dexametasona (2 mg/kg, v.o.) durante 4 dias. Uma hora após o último tratamento os animais, que permaneceram por 24h sem água e ração, porém com uma solução de glicose 5% *ad libitum*, foram tratados por via retal com ácido acético 5% (100 µl). No dia seguinte os animais foram sacrificados e foi avaliada a característica geral do baço e do cólon. Além de atribuído um escore macroscópico para as eventuais alterações sugestivas de inflamação para o cólon: 0 - normal, 1 - leve eritema, 2 - eritema e edema e 3 - eritema, edema e ulcerações.

### **3.10. Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (open-field)**

O teste do campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de que as ações do EE de *Melissa officinalis* sobre a memória e a nocicepção poderiam estar relacionadas com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (RODRIGUES *et al.*, 1996). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (crossing), foi contado cumulativamente durante 6 min. Os animais foram tratados com EE de *Melissa officinalis* (30 -300 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.) 60 min antes da realização do experimento.

### **3.11. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis***

A fim de avaliar alguns dos possíveis mecanismos de ação pelo qual o EE de *Melissa officinalis* exerce seu efeito antinociceptivo na nocicepção induzida pelo glutamato, os animais foram tratados com diferentes drogas. As doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura (SANTOS *et al.*, 1999, 2005; KASTER *et al.*, 2005; GADOTTI *et al.*,

2006; MEOTTI *et al.*, 2006; PIETROVSKI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; SEOANE *et al.*, 2007) e dados obtidos previamente em nosso laboratório.

### **3.11.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico, da substância P e das citocinas pró-inflamatórias**

Com o intuito de evidenciar se a atividade antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) depende da estimulação do sistema nervoso central, aminoácidos excitatórios, substância P (SP) e citocinas pró-inflamatórias foram administrados intratecalmente. O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por SCHEIDT *et al.* (2002) e GADOTTI *et al.* (2006). Os animais receberam uma injeção intratecal de 5 µL dos aminoácidos excitatórios, substância P ou citocinas pró-inflamatórias. As administrações foram realizadas com o animal acordado, utilizando o método descrito por HYLDEN e WILCOX (1980). Os animais foram contidos manualmente, e uma agulha adaptada a uma microseringa de 25 µL (Hamilton) foi inserida entre as vértebras L5-L6 dentro do espaço subdural. As injeções foram administradas durante o período de 5 segundos, e a resposta nociceptiva foi avaliada após a administração de AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), Cainato (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo Cainato, 110 pmol/sítio), trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II, 50 nmol/sítio), SP (agonista preferencial de receptores NK<sub>1</sub>, 100 pmol/sítio), IL-1B (citocina pró-

inflamatória, agonista do receptor IL-1R tipos I e II, 1 pg/sítio) e TNF- $\alpha$  (citocina pró-inflamatória, agonista do receptor TNF-R tipos I e II, 0,1 pg/sítio). O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas posteriores, abdômen ou cauda foi cronometrado e registrado como indicativo de nocicepção. Neste modelo, uma mordida é definida como um simples movimento da cabeça em direção ao abdômen ou membros posteriores, resultando no contato do focinho do animal com o órgão alvo. O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado de acordo com o tempo padronizado para cada agonista: AMPA: 1 min; NMDA: 5 min; Cainato: 4 min; trans-ACPD: 15 min; SP: 6 min; IL-1B: 15 min; TNF - $\alpha$ : 15 min (URCA & RAIGORODSKY, 1988; BOXALL *et al.*, 1998; SCHEIDT *et al.*, 2002).

### **3.11.2. Envolvimento do sistema opióide**

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis*, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 20 min os animais receberam EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 2,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.). A resposta nociceptiva ao glutamato (i.pl.) foi avaliada 60, 30 e 60 min após a administração do EE de *Melissa officinalis*, morfina ou veículo, respectivamente.

### 3.11.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

Com o objetivo de evidenciar a participação da via do óxido nítrico na ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis*, os animais foram pré-tratados com L-arginina (precursor da síntese do óxido nítrico, 40 mg/kg, i.p.), D-arginina (isômero inativo da L-arginina, 40 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), 20 min antes da administração do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), L-NOARG (inibidor da síntese do óxido nítrico, 25 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.). O efeito nociceptivo do glutamato (i.pl.) foi registrado 60, 30 e 60 min após a administração do EE de *Melissa officinalis*, L-NOARG ou veículo, respectivamente.

### 3.11.4. Envolvimento do sistema colinérgico

Para verificar a interação do efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis* sobre o sistema colinérgico, os animais foram pré tratados com atropina (antagonista muscarínico não seletivo, 1 mg/kg; i.p.), mecamilamina (antagonista nicotínico  $\alpha_2\beta_3$  seletivo, 2 mg/kg; i.p.) ou veículo (0,9%; 10 ml/kg; i.p.) 30 minutos antes da administração do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), pilocarpina (agonista muscarínico não seletivo, 3 mg/kg; i.p.), nicotina (agonista nicotínico não seletivo, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.). A resposta nociceptiva ao glutamato (i.pl.) foi avaliada 60 min

após a administração do EE de *Melissa officinalis* ou veículo, e 30 min após a administração de pilocarpina ou nicotina.

### **3.12. Efeito do ácido rosmarínico no modelo do glutamato**

Conforme diversos dados da literatura, um dos componentes mais expressivos no EE de *Melissa officinalis* é um ácido polifenólico, o ácido rosmarínico. Ele se faz presente em concentrações entre 2 e 5% no EE de *Melissa officinalis*. Diante disso, foi avaliado o possível efeito do ácido rosmarínico no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram tratados com ácido rosmarínico (0,3 - 3 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) pela via oral (v.o.) 1 h antes da injeção de glutamato.

### **3.13. Esquiva inibitória**

Com o intuito de investigar a possível ação do EE de *Melissa officinalis* no processo de formação de memória, o modelo da esquiva inibitória foi realizado em ratas. Este modelo permite avaliar processos de aprendizagem e memória, tarefas essas que dependem de ativação hipocampal e estão extremamente envolvidas com o sistema glutamatérgico (BERNABEU *et al.*, 1997; BEVILAQUA *et al.*, 2003; CAMMAROTA *et al.*, 2004). O aparelho de esquiva inibitória consiste em uma caixa de vidro e plástico medindo 50 x 25 x 25 cm com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento, e no canto esquerdo apresenta uma série de barras de bronze que constituem o assoalho da caixa. Durante o treino os animais (ratas) foram

cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. Assim que o animal descia da plataforma e colocava as quatro patas na grade ele recebia um choque de 0.4 mA por 1 s nas patas, sendo imediatamente retirado da caixa de treino. Os animais foram tratados com EE de *Melissa officinalis* (30 - 1000 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) logo após o treino (retenção de memória) ou 1 h antes do treino (aquisição de memória). A memória de curta e longa duração foi avaliada no modelo da esquiva inibitória 1,5 e 24 h depois do treino, respectivamente. No teste, os animais treinados foram colocados de costas na plataforma, e o tempo (latência) que eles levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória. O intervalo de 180 s foi padronizado como o tempo máximo de espera (latência) para a descida do animal da plataforma durante as avaliações.

### **3.14. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE de *Melissa officinalis* na facilitação da memória**

A fim de avaliar alguns dos possíveis mecanismos de ação pelo qual o EE de *Melissa officinalis* exerce seu efeito facilitador na memória no modelo da esquiva inibitória, os animais foram tratados com diferentes drogas. As doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura (NETTO *et al.*, 1990; ROESLER *et al.*, 1999; BARROS *et al.*, 2005; KAHVECI *et al.*, 2006) e dados obtidos previamente em nosso laboratório.

### 3.14.1. Envolvimento do Sistema Glutamatérgico

A fim de avaliar a participação do sistema glutamatérgico na atividade do EE de *Melissa officinalis* sobre a memória no modelo da esquiva inibitória, os animais foram pré-tratados com MK-801 (antagonista NMDA não competitivo; 0,01 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 min receberam EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg; v.o.) ou veículo (10 ml/kg; v.o.). Decorridos 60 min do tratamento com o EE de *Melissa officinalis* os animais foram submetidos ao teste da esquiva inibitória, conforme descrito anteriormente.

### 3.14.2. Envolvimento do Sistema colinérgico

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema colinérgico na facilitação do aprendizado e da memória promovida pelo EE de *Melissa officinalis* no modelo da esquiva inibitória, os animais foram pré-tratados com atropina (antagonista muscarínico não seletivo; 1 mg/kg, i.p.), mecamilamina (antagonista nicotínico  $\alpha 3\beta 4$  seletivo, 5 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 min receberam EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg; v.o.) ou veículo (10 ml/kg; v.o.). Decorridos 60 min do tratamento com o EE de *Melissa officinalis* os animais foram submetidos ao teste da esquiva inibitória, conforme descrito anteriormente.

### 3.14.3. Envolvimento da via L-arginina- Óxido nítrico

Objetivando avaliar o envolvimento da via L-arginina-Óxido nítrico na facilitação do aprendizado e da memória promovida pelo EE de *Melissa officinalis*, no modelo da esQUIVA inibitória, os animais foram pré-tratados com L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico; 2 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 minutos após receberam EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg; v.o.) ou veículo (10 ml/kg; v.o.). Decorridos 60 min do tratamento com o EE de *Melissa officinalis* os animais foram submetidos ao teste da esQUIVA inibitória, conforme descrito anteriormente.

### 3.15. Análise estatística

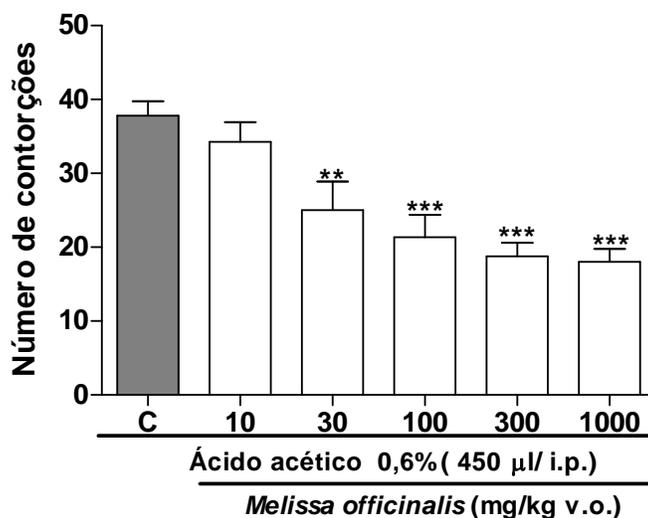
Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), de uma via ou de medidas repetidas, dependendo do experimento, seguido pelo teste de Newman-Keuls ou teste “*t*” não pareado de Student, quando apropriado e expressos como a média  $\pm$  E.P.M. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como indicativo de significância. Os valores da  $DI_{50}$  (dose do EE ou do ácido rosmarínico que reduziu 50% a resposta nociceptiva em relação ao grupo controle [veículo]) estão apresentados como média geométrica acompanhada pelo seu respectivo intervalo de confiança (95%). Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos através do método de regressão linear utilizando o software “Graph Pad InStat®” (GraphPad software, San Diego, CA). Os resultados do experimento da esQUIVA inibitória foram apresentados em medianas acompanhadas dos intervalos interquartis. A diferença entre os

grupos foi obtida por estatística não paramétrica através dos testes U de Mann Whitney e teste de Kruskal Wallis.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Nociceção induzida pelo ácido acético

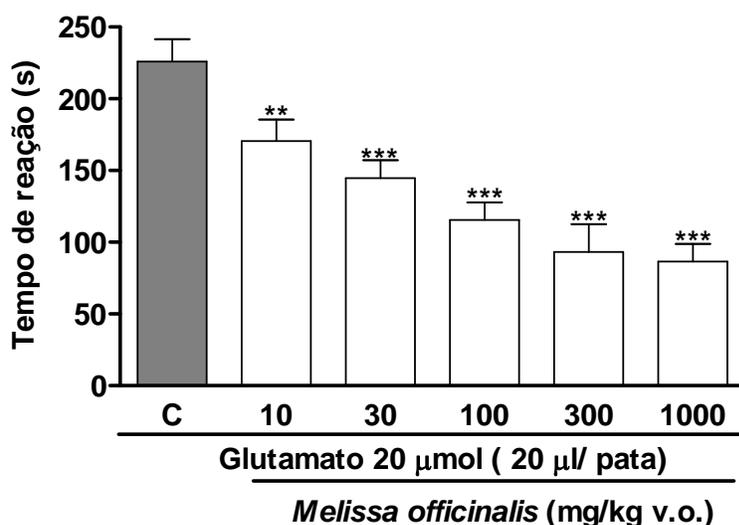
Os resultados apresentados na figura 6 mostram que o EE de *Melissa officinalis*, administrado por v.o., inibiu de forma significativa e dependente da dose, do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de  $DI_{50}$  (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 241,92 (203,92 -289,37) mg/kg e inibição de  $52 \pm 5\%$  na dose de 1000 mg/kg.



**Figura 6:** Avaliação do efeito antinociceptivo (10-1000 mg/kg, v.o.) do EE de *Melissa officinalis* na nociceção induzida por ácido acético 0,6% (450  $\mu$ l, i.p.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (C) (pelo teste de Newman-Keuls).

## 4.2. Nociceção induzida pelo glutamato

O tratamento dos animais com o EE de *Melissa officinalis* (10-1000 mg/kg, v.o.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nociceção induzida pela injeção i.pl. de 20  $\mu$ mol/pata de glutamato tamponado, com uma  $DI_{50}$  de 198,54 (146,37-261,21) mg/kg e inibição de  $62 \pm 5\%$  na maior dose testada (Fig. 7).

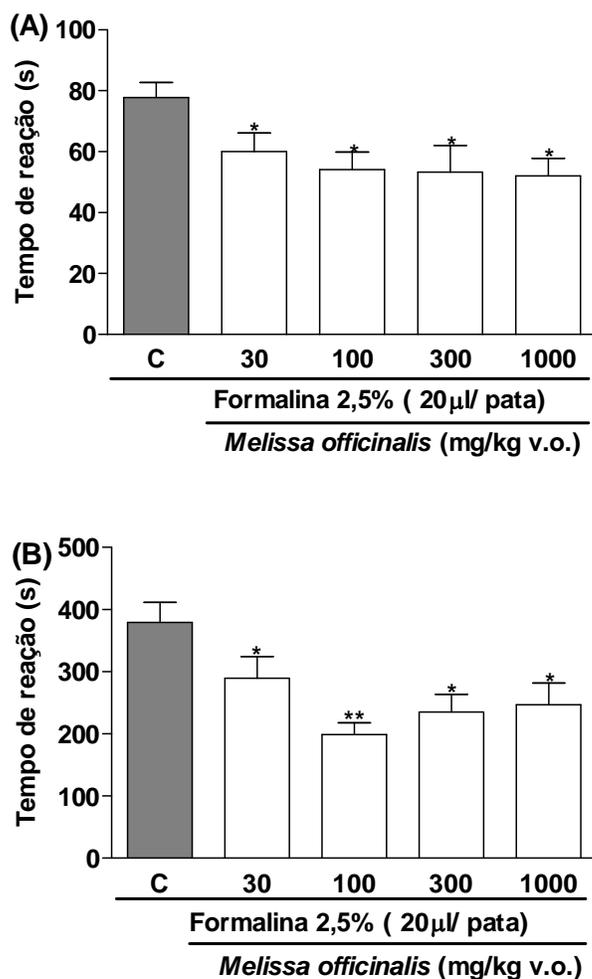


**Figura 7:** Avaliação do efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis* (10-1000 mg/kg, v.o.) na nociceção induzida por glutamato (20  $\mu$ mol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (C) (pelo teste de Newman-Keuls).

## 4.3. Nociceção induzida pela formalina

Os resultados apresentados na figura 8 demonstram que o EE de *Melissa officinalis* (30-1000 mg/kg, v.o.) inibiu de maneira significativa tanto a fase neurogênica (0-5 min, A) quanto a fase inflamatória (15-30 min, B) da

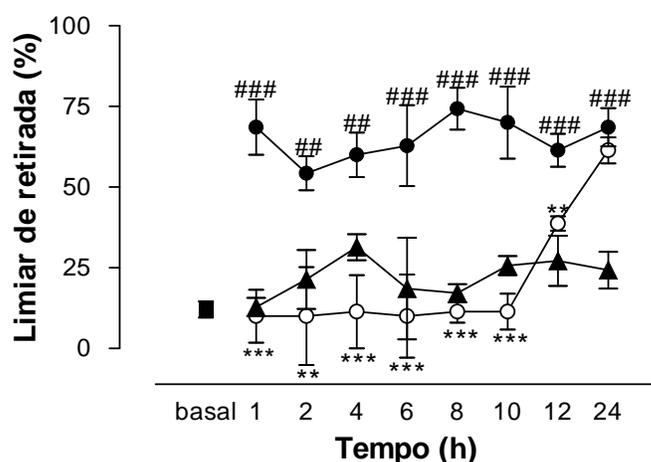
nociceção induzida pela formalina (2,5%). As inibições causadas pela dose de 100 mg/kg foram de  $33 \pm 7$  e  $48 \pm 5\%$ , respectivamente.



**Figura 8:** Efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis* (30-1000 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nociceção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparados ao grupo controle (C) (pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.4. Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático

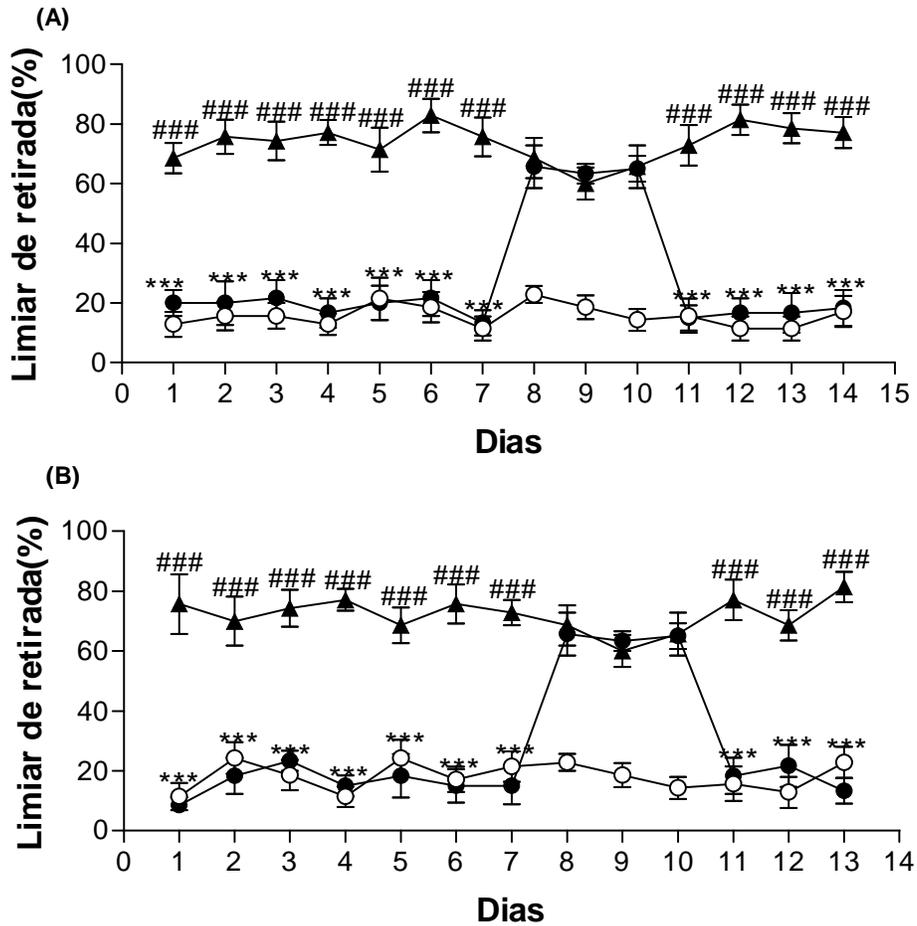
O tratamento agudo com EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) reverteu completamente a alodínia mecânica avaliada através do filamento de Von Frey na pata dos animais operados, sendo que seu efeito ocorreu a partir da primeira hora (inibição de 100%) após a sua administração e permaneceu de forma significativa por até 12 horas (Fig. 9).



**Figura 9:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (▲) representa o grupo falso-operado (Sham) que recebeu veículo (10 ml/kg, v.o.); (●) representa o grupo operado que recebeu veículo (10 ml/kg, v.o.); (○) simboliza o grupo operado que recebeu o EE. O grupo identificado como Basal representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo operado + veículo e ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo falso-operado (pelo teste ANOVA de 2 vias).

Quando administrado diariamente, o EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), demonstrou ser efetivo em reduzir completamente a alodínia mecânica avaliada 2 h (Fig. 10) e também em 10 h (Fig. 10B) após a sua administração. Além disso, a interrupção do tratamento com o EE do 8<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup>

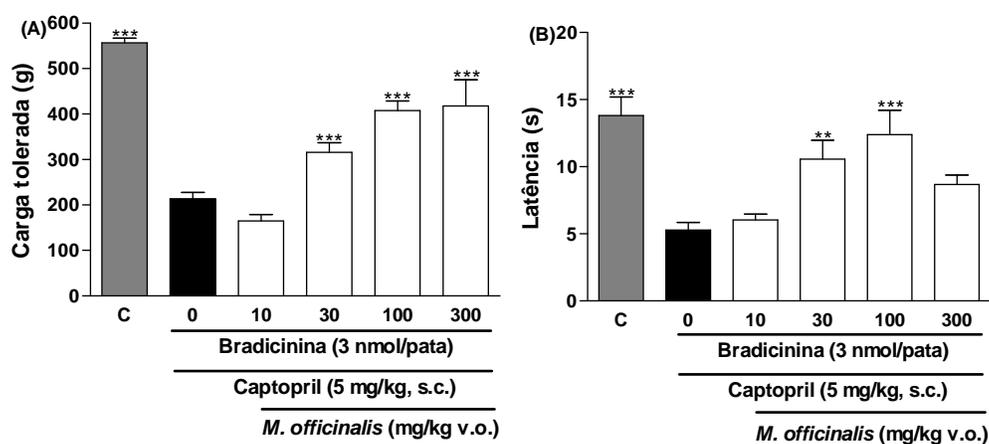
dia após o início do tratamento não alterou a sua eficácia nos dias subsequentes.



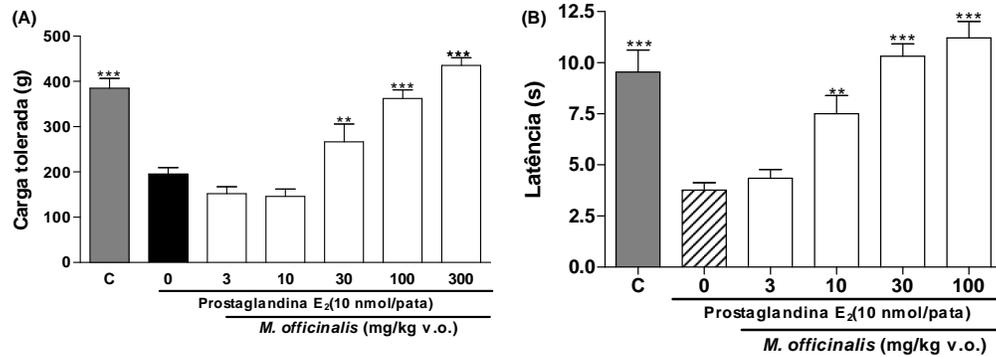
**Figura 10:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) 2 (A) e 10 (B) horas após o tratamento diário, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (▲) representa o grupo operado que recebeu veículo (10 ml/kg, v.o.); (○) representa o grupo falso-operado que recebeu veículo (10ml/kg, v.o.); (●) representa o grupo operado que foi submetido ao tratamento com o EE. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo operado + veículo e ### p<0,001 comparado ao grupo falso operado (pelo teste ANOVA de 2 vias).

#### 4.5. Hiperalgisia induzida por agentes flogísticos

Nos modelos de hiperalgisia mecânica e térmica, descritos por Randall-Selitto e por Hargreaves, respectivamente, o EE de *Melissa officinalis* (3-300 mg/kg, v.o.) reverteu a hiperalgisia mecânica e térmica induzida pela injeção i.pl. de BK (3 nmol/pata) (Figura 11), com inibições de 59±10 e 83±2% e  $DI_{50}$  de 94,73 (85,25-104,20) e 27,09 (26,54-27,63) mg/kg, respectivamente; bem como a resposta causada pela Prostaglandina E<sub>2</sub> (10 nmol/pata) (Figura 12) com inibições de 100 e 83±2% e  $DI_{50}$  de 32,04 (29,15-34,93) e 19,40 (16,68-22,12) mg/kg, respectivamente.

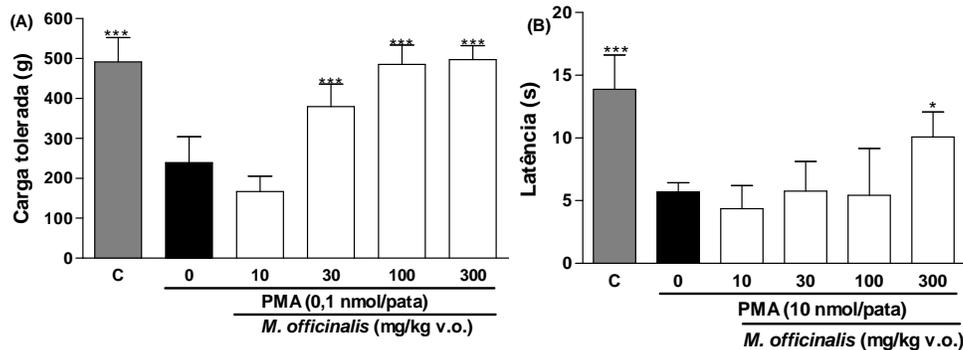


**Figura 11:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (10 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgisia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de bradicinina (BK, 3 nmol/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. \*\*p < 0,01 e \*\*\*p<0,001 diferem significativamente do grupo tratado somente com BK (pelo teste de Newman-Keuls).



**Figura 12:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (3 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 10nmol/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. Cada grupo representa a média e 6-10 animais. \*\*p < 0,01 e \*\*\*p<0,001 diferem significativamente do grupo tratado somente com PGE<sub>2</sub> (pelo teste de Newman-Keuls).

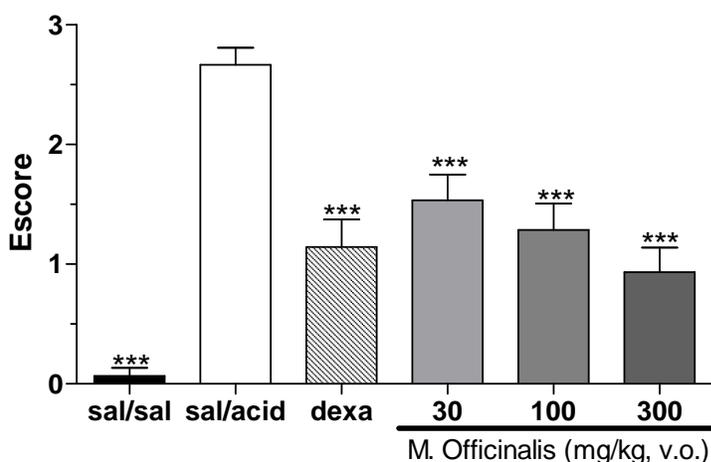
Além disso, o tratamento dos animais com o EE de *Melissa officinalis* também foi capaz de reverter de forma significativa a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pelo PMA (0,1 nmol/pata) (Figura 13), com inibições de 100 e 54±12% e DI<sub>50</sub> de 29,07 (27,30-30,86) e 288,91 (254,24- 323,58) mg/kg.



**Figura 13:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (10 - 300 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica (A) e térmica (B) induzida pela injeção intraplantar de PMA (0,1nmol/pata) em ratos. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. \*p<0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p<0,001 diferem significativamente do grupo tratado somente com PMA (pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.6. Indução de Colite por injeção intra-retal de ácido acético

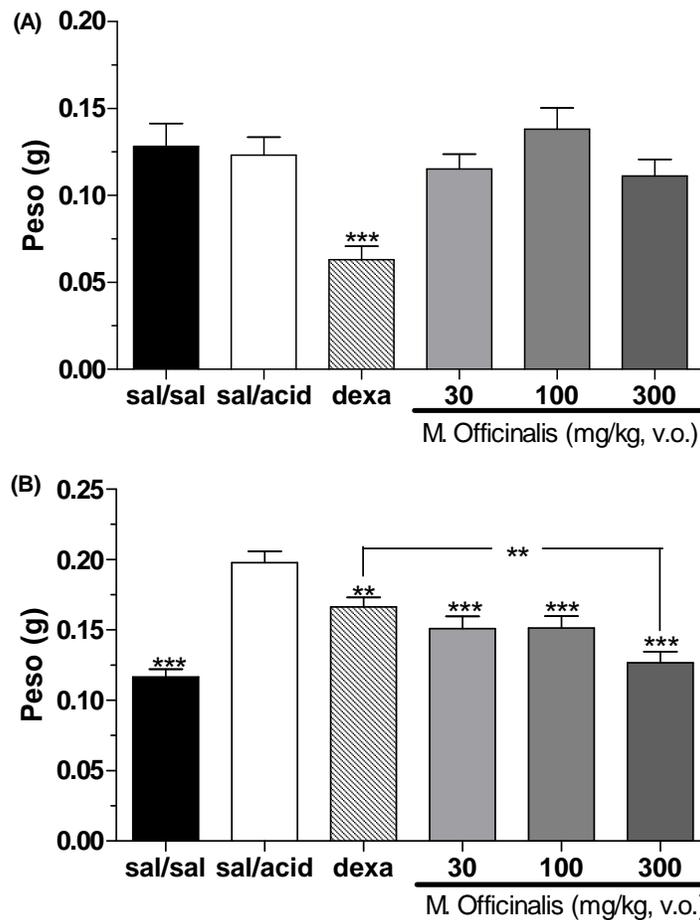
O tratamento com EE de *Melissa officinalis* foi capaz de prevenir os sinais da agressão intra colo retal causada pela administração intra-retal de ácido acético (5%, 150 µl), segundo um escore, com inibição de 65±8% e DI<sub>50</sub> de 230,76 (193,84-267,68) mg/kg. Como controle positivo foi utilizado a Dexametasona (2 mg/kg, v.o.), que apresentou inibição de 57±8% para o mesmo parâmetro.



**Figura 14:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (30 - 300 mg/kg, v.o.) na prevenção de lesão no cólon de animais que receberam ácido acético (5%, 150µl) por via retal. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. \*\*\*p<0,001 difere significativamente do grupo controle (sal/acid) (pelo teste de Newman-Keuls).

Além do parâmetro acima analisado, foram avaliados o peso do cólon e do baço dos animais. O EE de *Melissa officinalis* (30 - 300 mg/kg, v.o.) não reduziu o peso do baço, como aconteceu com seu fármaco de referência a dexametasona (2 mg/kg, v.o.) que diminuiu em 48±8% o peso do órgão (Fig. 15A). No entanto, as mesmas doses do extrato foram eficazes em reduzir de forma significativa o peso do cólon, com inibição de 36±4% na dose de 300

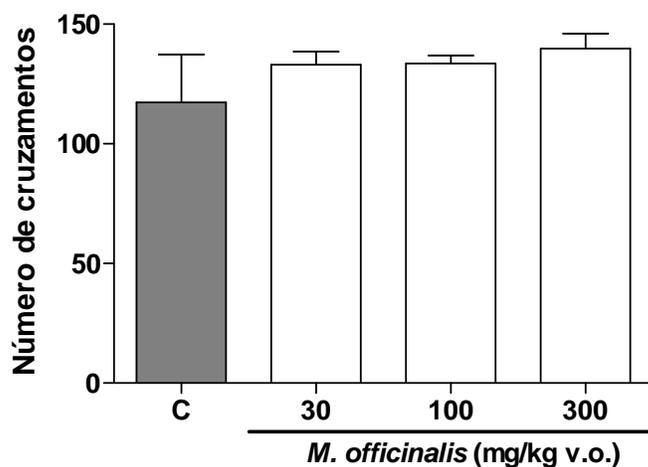
mg/kg, além disso, o efeito do extrato foi significativamente maior que o obtido com a dexametasona ( $14 \pm 3\%$ ).



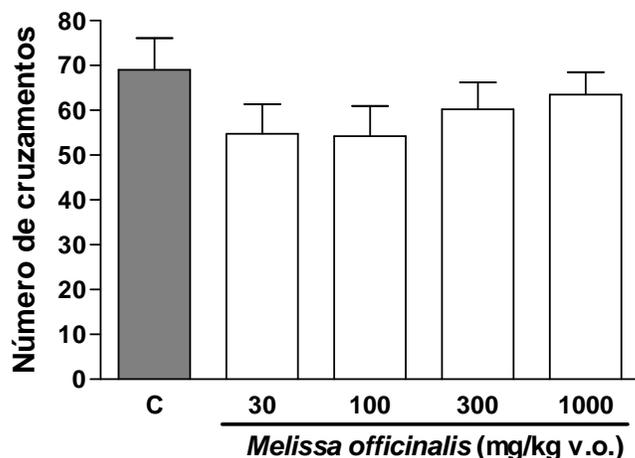
**Figura 15:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (30 - 300 mg/kg, v.o.) e da Dexametasona (2mg/kg, v.o.) no peso do baço (A) e do cólon (B) de animais que receberam ácido acético (5%, 150  $\mu$ l) por via retal. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  difere significativamente do grupo controle (sal/acid) (pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.7. Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (open-field)

O tratamento dos animais com EE de *Melissa officinalis* (30 - 1000 mg/kg, v.o.), doses nas quais apresentaram significativo efeito antinociceptivo, não foram capazes de causar mudança significativa sobre a atividade locomotora de camundongos (Figura 16) e ratos (Figura 17) quando avaliados no teste do campo-aberto.



**Figura 16:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (30 - 300 mg/kg, v.o.) sobre a atividade locomotora de camundongos avaliados no modelo do campo aberto. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais (pelo teste de Newman-Keuls).

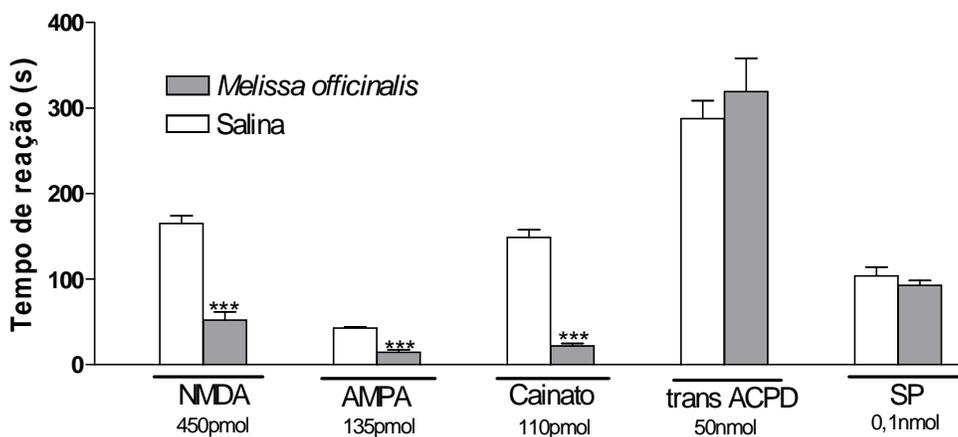


**Figura 17:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (30 - 1000 mg/kg, v.o.) sobre a atividade locomotora de ratos avaliados no modelo do campo aberto. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Cada grupo representa a média de 6-10 animais (pelo teste de Newman-Keuls).

#### 4.8. Análise dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis*

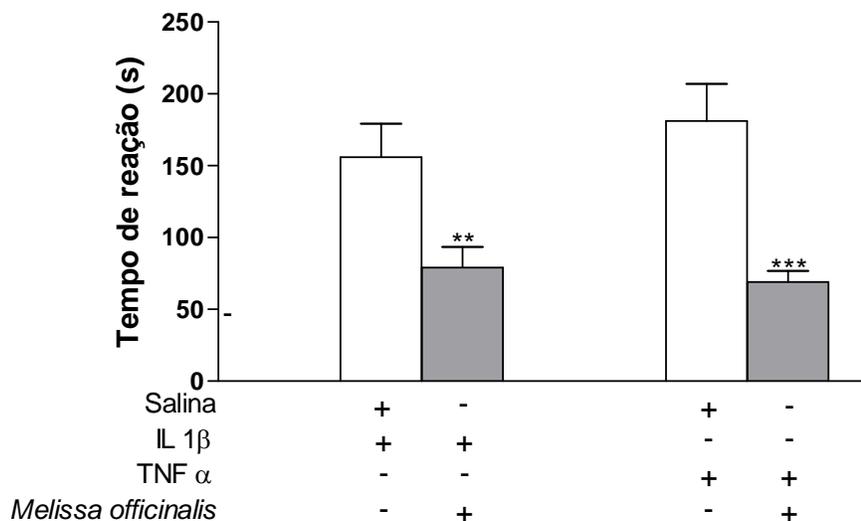
##### 4.8.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico, da substância P e das citocinas pró-inflamatórias

O tratamento dos animais com o EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg), administrado pela via oral 1 h antes do teste, reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de NMDA, AMPA e cainato, com inibições de  $68 \pm 5$ ,  $66 \pm 7$  e  $85 \pm 2\%$ , respectivamente, porém não foi capaz de inibir a nocicepção induzida por trans-ACPD e SP (Fig. 18).



**Figura 18:** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP em camundongos. Os agonistas: Trans-ACPD (50 nmol/sítio), NMDA (450 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), Cainato (110 pmol/sítio) e SP (0,1 nmol/sítio) foram injetados pela via intratecal, 1 h após a administração do EE de *Melissa officinalis*. As barras indicam uma media 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo (barras brancas) (pelo teste "t" não pareado).

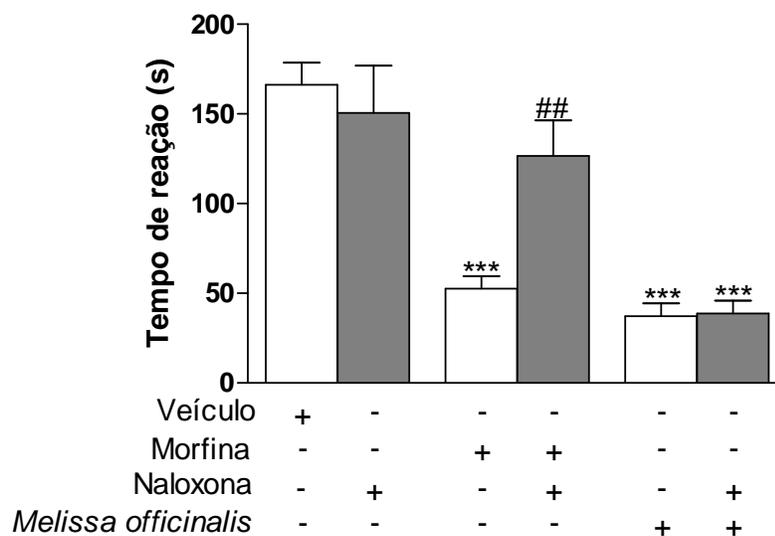
De forma similar, o tratamento dos animais com o EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg), administrado pela via oral 1 h antes do teste, reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , com inibições de  $49 \pm 9$  e  $62 \pm 4\%$ , respectivamente (Fig. 19).



**Figura 19:** Efeito do EE de *Melissae officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias em camundongos. As citocinas: IL-1B (1 pg/sítio) e TNF-α (0,1 pg/sítio) foram injetadas pela via intratecal, 1 h após a administração do EE de *Melissae officinalis*. As barras indicam uma media 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam o nível de significância: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo veículo (barras brancas) (pelo teste “t” não pareado).

#### 4.8.2. Envolvimento do sistema opióide

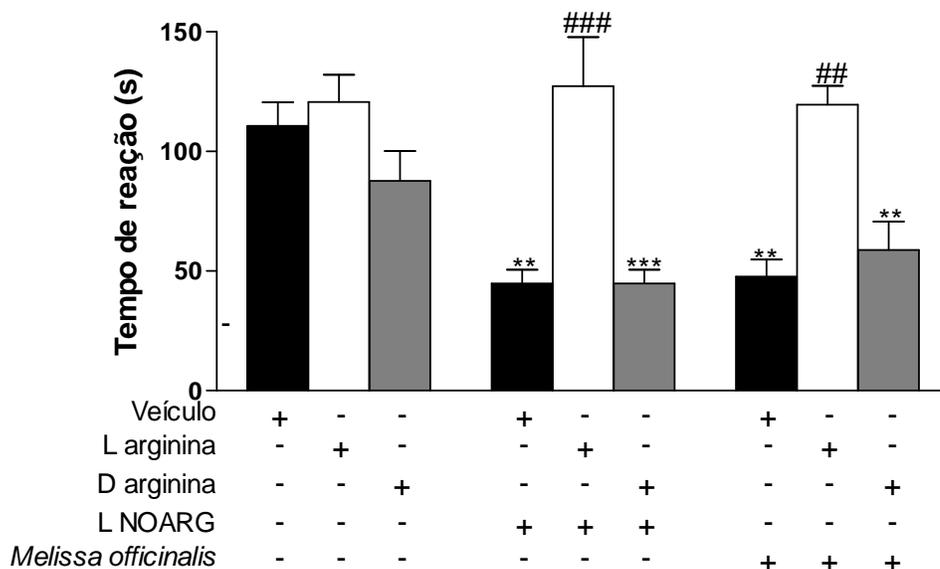
Os resultados apresentados na Fig. 20 demonstram que o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores opióides), administrado 20 min antes do EE, morfina ou veículo, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.), mas não o efeito antinociceptivo do EE de *Melissae officinalis* quando analisado no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (i.pl.).



**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo veículo e ## $p < 0,01$  comparado ao grupo veículo+morfina (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.8.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

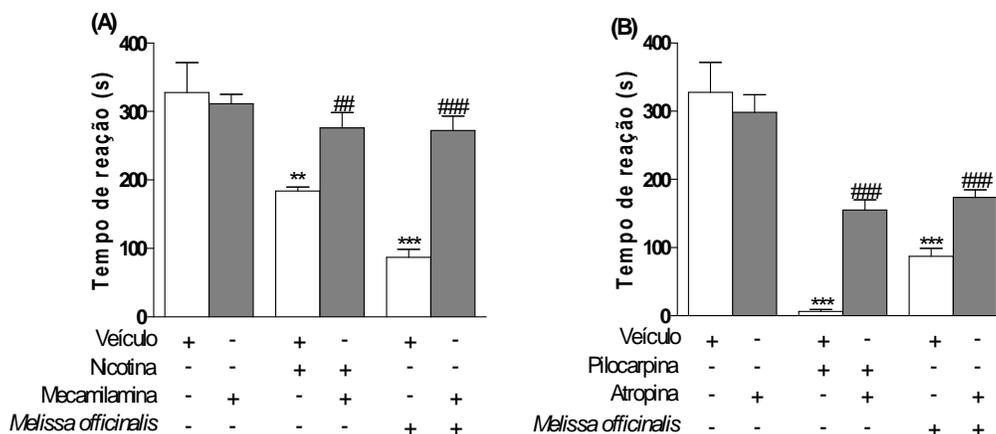
O pré-tratamento dos animais com o precursor do óxido nítrico, L-arginina (40 mg/kg, i.p.), administrado 20 min antes do tratamento, mas não a D-arginina (40 mg/kg, i.p., isômero inativo da L-arginina), preveniu completamente a antinocicepção causada tanto pela L-NOARG (25 mg/kg, i.p., inibidor da sintase de óxido nítrico) quanto pelo EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Fig. 21).



**Figura 21:** Efeito do tratamento prévio dos animais com L-arginina (40 mg/kg i.p.) ou D-arginina (40 mg/kg i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) e L-NOARG (25 mg/kg, i.p.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação aos grupos veículo, L-arginina e D-arginina; e ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao grupo veículo + L-NOARG ou veículo + EE de *Melissa officinalis* (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.8.4. Envolvimento do sistema colinérgico

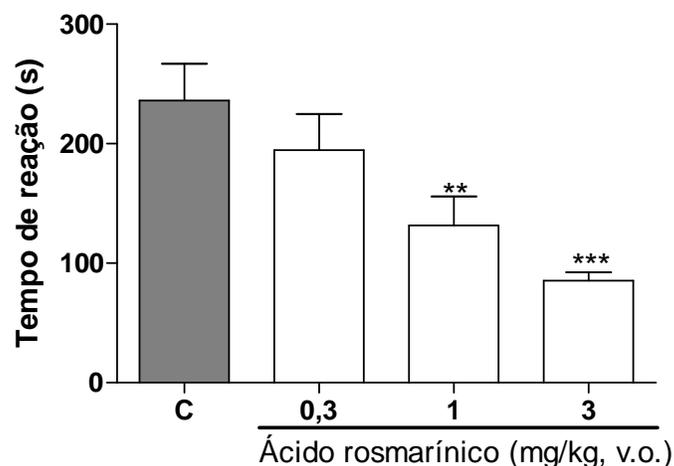
A figura 22 demonstra que o pré-tratamento dos animais com os antagonistas colinérgicos mecamilamina (2 mg/kg, i.p.) e atropina (1 mg/kg, i.p.), administrados 30 minutos antes do tratamento, preveniu completamente a antinocicepção causada pelos agonistas colinérgicos nicotina (1 mg/kg, i.p.) e pilocarpina (3 mg/kg, i.p.), bem como pelo EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato.



**Figura 22:** Efeito do pré-tratamento dos animais com mecamilamina (2 mg/kg, i.p., **A**) ou atropina (1 mg/kg, i.p., **B**) sobre a atividade antinociceptiva da nicotina (1 mg/kg, i.p., **A**) e da pilocarpina (3 mg/kg, i.p. **B**), bem como do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação aos grupos veículo ou antagonista e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo + agonista ou veículo + EE de *Melissa officinalis* (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.9. Efeito do ácido rosmarínico no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato

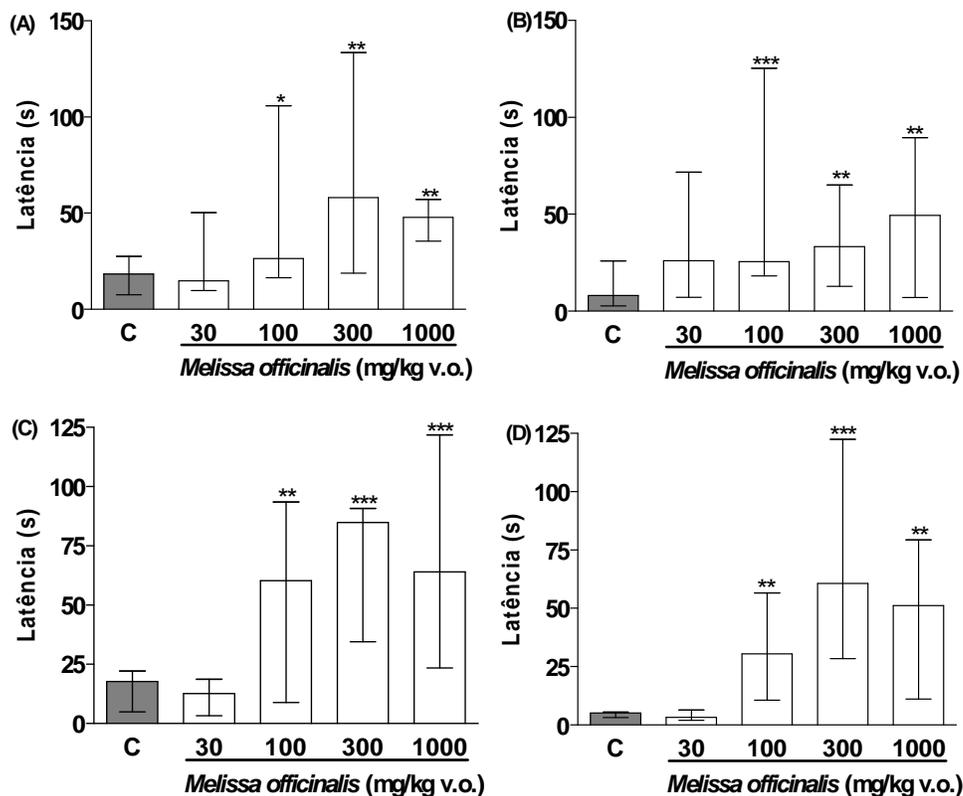
O tratamento sistêmico dos animais com o ácido rosmarínico (0,3 - 3 mg/kg, v.o.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de 20  $\mu\text{mol/pata}$  de glutamato tamponado, com uma  $DI_{50}$  de 2,64 (2,50 - 2,78) mg/kg e inibição de  $64 \pm 3\%$  na maior dose testada (Fig. 23). É importante mencionar que a  $DI_{50}$  do ácido rosmarínico foi cerca de 74 vezes menor que a  $DI_{50}$  do EE para o modelo de nocicepção do glutamato.



**Figura 23:** Avaliação do efeito antinociceptivo dependente da dose (0,3 - 3 mg/kg, v.o.) de ácido rosmarínico na nocicepção induzida por glutamato tamponado (20  $\mu$ mol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (C) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.10. Esquiva inibitória

Os dados apresentados na figura 24 mostram que o EE de *Melissa officinalis*, aumentou de forma significativa a latência dos animais à aquisição (Fig. 24 A e B) e à retenção (Fig. 24 C e D) da memória de curta (STM, 1,5 h) e longa duração (LTM, 24 h) no modelo de esquiva inibitória em ratas. A administração do EE foi realizada pela via oral 1 hora antes (para avaliar a aquisição) ou logo após (para avaliar a retenção) o treino no aparelho de esquiva inibitória.

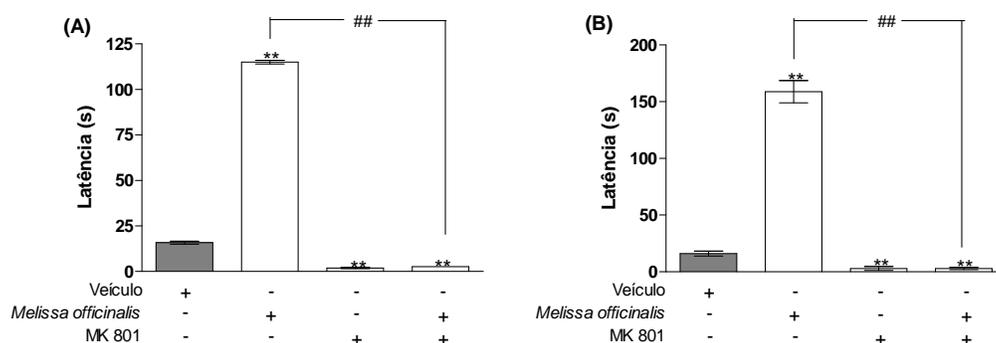


**Figura 24.** Efeito do EE de *Melissa officinalis* (30 - 1000 mg/kg, v.o.) sobre a aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta (STM, A e C) e de longa duração (LTM, B e D), no modelo de esQUIVA inibitória em ratos. As barras indicam a mediana de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam seu intervalo interquartil, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  (pelo teste de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

#### 4.11. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE de *Melissa officinalis* na facilitação da aquisição da memória

##### 4.11.1. Envolvimento do Sistema Glutamatérgico

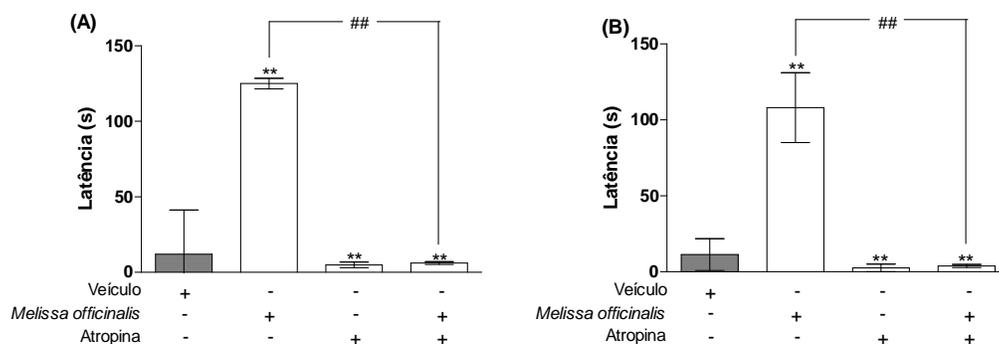
O pré-tratamento com MK-801 (0,01 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter o efeito facilitador da memória do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) no modelo da esQUIVA inibitória, conforme mostra a figura 25.



**Figura 25:** Efeito da administração MK 801 (0,01mg/kg, i.p.) sobre ação do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na aquisição da memória de curta (STM, **A**) e de longa duração (LTM, **B**), no modelo de esQUIVA inibitória em ratas. As barras indicam a mediana de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam seu intervalo interquartil, \*\* p<0,01 comparado ao grupo veículo e ##p<0,01 na comparação entre o grupo tratado com EE de *Melissa officinalis* e o grupo EE + MK 801 (pelo teste de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

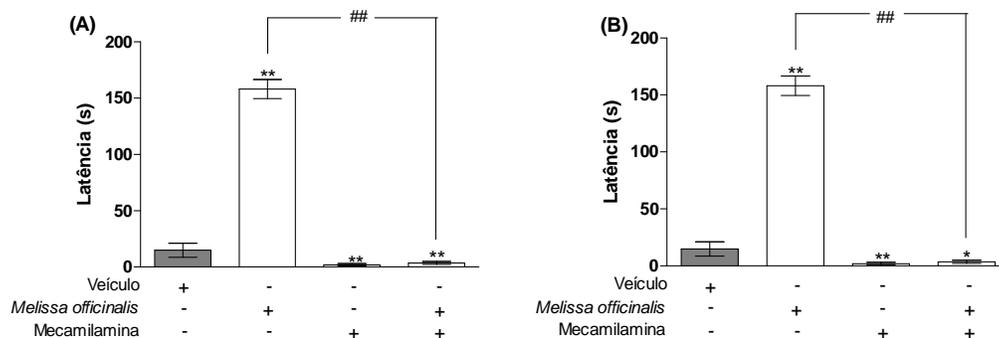
#### 4.11.2. Envolvimento do Sistema colinérgico

Como demonstra a figura 26, o pré-tratamento dos animais com atropina (1 mg/kg, i.p.) inibiu o efeito facilitador da memória do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) no modelo da esQUIVA inibitória, tanto na memória de curta duração, como na memória de longa duração.



**Figura 26:** Efeito da administração de atropina (1 mg/kg, i.p.) sobre a ação do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na aquisição da memória de curta (STM, **A**) e de longa duração (LTM, **B**), no modelo de esquia inibitória em ratas. As barras indicam a mediana de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam seu intervalo interquartil, \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo veículo e ##  $p > 0,01$  na comparação entre o grupo EE de *Melissa officinalis* e o grupo atropina + EE (pelo teste de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

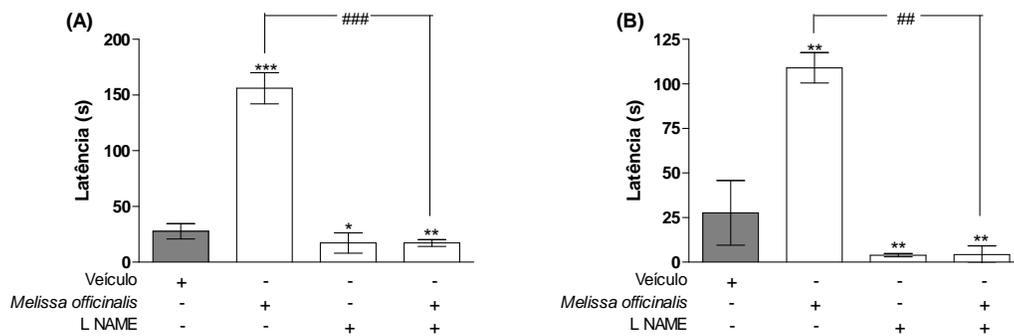
A figura 27 demonstra que o pré-tratamento com mecamilamina (5 mg/kg, i.p.) foi efetivo em inibir a resposta facilitatória do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) frente ao modelo da esquia inibitória tanto na memória de curta, como na de longa duração.



**Figura 27:** Efeito da administração mecamilamina (5 mg/kg, i.p.) sobre a ação do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na memória de curta (STM, **A**) e de longa duração (LTM, **B**), no modelo de esquia inibitória em ratas. As barras indicam a mediana de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam seu intervalo interquartil, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparados ao grupo veículo e ## $p < 0,01$  a comparação entre o grupo tratado somente com EE e o grupo EE + mecamilamina (pelos testes de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

#### 4.11.3. Envolvimento da via L-arginina- Óxido nítrico

A administração de L-NAME (2 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito facilitador da memória do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) no modelo da Esquiva Inibitória em ratas, na memória de curta e na memória de longa duração.



**Figura 28:** Efeito da administração L-NAME (2 mg/kg, i.p.) sobre a ação do EE de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.) na memória de curta (STM, **A**) e de longa duração (LTM, **B**), no modelo de esquiva inibitória em ratas. As barras indicam a mediana de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam seu intervalo interquartil, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo veículo e ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  quando comparados o grupo tratado somente com EE de *Melissa officinalis* e o grupo EE + L-NAME (pelos testes de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o extrato etanólico (EE) de *Melissa officinalis* apresenta atividade antinociceptiva nos diferentes modelos de nocicepção térmica, química e mecânica, quando administrado pela via oral.

Optou-se por começar a investigação de uma possível atividade antinociceptiva do referido extrato por um modelo de dor visceral, tal como o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Assim, comprovou-se que a administração sistêmica pela via oral do EE de *Melissa officinalis* inibiu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, de forma dependente da dose. Este modelo é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (COLLIER *et al.*, 1968; DUARTE *et al.*, 1988; REICHERT *et al.*, 2001). Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas vias aferentes primárias (JULIUS & BASBAUM, 2001). Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como PG, BK, SP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, entre outros (COLLIER *et al.*, 1968; VINEGAR *et al.*, 1979; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Estes mediadores estimulam neurônios aferentes primários aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluído cerebrospinal (FENG *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2004). Em função disto, este modelo

apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade. Uma vez que a nocicepção induzida pelo ácido acético pode ser prevenida por agentes antiinflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos (REICHERT *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2003).

Para descartar qualquer efeito inespecífico, tais como diminuição da deambulação do animal ou sedação, que pudesse interferir nos resultados dos experimentos com o EE de *Melissa officinalis* foi realizado o teste do campo aberto, em ratos e camundongos. Assim, pode-se observar que nenhuma alteração significativa foi encontrada, quando o EE foi administrado nos animais, nas doses que se mostraram efetivas no modelo do ácido acético. Demonstrando que a atividade nociceptiva nos modelos de nocicepção é específica e não devido a efeitos sobre a musculatura esquelética do animal ou seu estado de consciência.

Este trabalho demonstrou que o EE de *Melissa officinalis*, quando administrado pela v.o. foi efetivo em inibir ambas as fases, neurogênica e inflamatória, da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina. A fase neurogênica decorre da ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto que a fase inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e de sensibilização central na medula espinhal (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992). Por outro lado, estudos demonstram que várias classes de fármacos tais como antagonistas NMDA, inibidores da NOS e AINES, são capazes de inibir a nocicepção induzida pela formalina (TJØLSEN *et al.*, 1992, MOORE *et al.*, 1993; MALMBERG & YAKSH, 1995; CHAPLAN *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 1998; SAWAMURA *et al.*, 1999). Desta forma, a administração intraplantar de formalina constitui um

excelente modelo para a investigação de substâncias potencialmente antinociceptivas. No entanto, este modelo não permite concluir o mecanismo pelo qual o EE de *Melissa officinalis* causa antinocicepção.

Os resultados apresentados no presente estudo evidenciam que a administração de EE de *Melissa officinalis* pela via oral produziu uma inibição significativa da resposta nociceptiva induzida por injeção intraplantar de glutamato em camundongos. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais, tendo ação mediada amplamente por receptores NMDA e não NMDA, assim como pela liberação de óxido nítrico ou por algumas vias de transmissão moduladas por nitro derivados (BEIRITH *et al.*, 2002, 2003; ROSA *et al.*, 2005). Vários estudos têm demonstrado que os receptores de aminoácidos excitatórios estão envolvidos na transmissão aferente primária nociceptiva, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta dolorosa (AANONSEN & WILCOX, 1987, 1990; COGGESHAL & CARLTON, 1997; FERREIRA *et al.*, 1999). Desta forma, a supressão da nocicepção induzida pelo glutamato em função do tratamento dos animais com o EE de *Melissa officinalis* pode estar associada a sua interação com o sistema glutamatérgico ou com a inibição da produção de óxido nítrico (FERREIRA *et al.*, 1999; BEIRITH *et al.*, 2003).

Assim, o modelo da nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato foi escolhido para a realização dos experimentos posteriores, com o intuito de elucidar os possíveis mecanismos de ação através dos quais o EE de *Melissa officinalis* estaria atuando para produzir seu efeito antinociceptivo. Dentre os sistemas envolvidos na ativação e inibição

das vias nociceptivas foram investigados os sistemas glutamatérgico, opióide, colinérgico e a via da L-arginina - óxido nítrico.

Os receptores glutamatérgicos são amplamente distribuídos no SNC e são divididos em: ionotrópicos (acoplados à canais iônicos) e metabotrópicos (acoplados à proteína G (mGluR)). Estudos recentes utilizaram agonistas e antagonistas seletivos de receptores glutamatérgicos para investigar o papel de cada grupo de receptores na nocicepção aguda e crônica. Os resultados levaram à conclusão de que todos os subtipos de receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e Cainato e receptores metabotrópicos (Grupos I, II e III) possuem papel relevante na estabilização ou manutenção destes estados dolorosos (NEUGEBAUER, 2001; CARLTON, 2001; SCHEIDT *et al.*, 2002; VARNEY & GEREAU, 2002; SAWYNOK, 2003). Os resultados encontrados sugerem que a antinocicepção produzida pelo EE de *Melissa officinalis* envolve o sistema glutamatérgico. Tal sugestão deriva do fato de que o extrato foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de NMDA, AMPA e Cainato; agonistas seletivos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo NMDA, AMPA e Cainato, respectivamente. No entanto, foi inefetivo frente ao agonista seletivo para receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II, trans-ACPD, e também frente a administração intratecal de SP.

Os dados do presente estudo também demonstraram que a administração v.o. de EE de *Melissa officinalis* inibiu a nocicepção induzida por injeção intratecal de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Já está bem estabelecido que a ligação da IL-1 $\beta$  ao seu receptor IL-1RI ativa PKC independentemente do cálcio (OBREA *et al.*, 2002). Em contrapartida,

Schafers e colaboradores (2003) descrevem que a nocicepção induzida pelo TNF- $\alpha$  envolve a fosforilação de quinases ativadas por mitógenos. Alguns autores demonstraram que flavonoides como a luteolina e quercitina, presentes no EE de *Melissa officinalis*, podem inibir a fosforilação das quinases ativadas por mitógenos, via inibição de PKC (CARNAT *et al.*, 1998; HEITZ *et al.*, 2000; WADSWORTH *et al.*, 2001; XAGORARI *et al.*, 2001). Sabe-se que flavonóides podem inibir PI-3 (Fosfoinositídeo 3-quinase), e conseqüentemente ativação da proteína quinase C (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999). No entanto, flavonoides também são capazes de inibir a PKC diretamente (AGULLO *et al.*, 1997), condições estas que demonstram uma possível atividade inibitória do EE de *Melissa officinalis* sobre a proteína quinase C por uma ação dos flavonóides nele presentes.

Acredita-se que os opióides produzam analgesia primariamente por sua ação no SNC (PASTERNAK, 1988; JAFFE & MARTIN, 1990). No entanto, é provável que o sistema opióide não esteja envolvido na ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis*, uma vez que a naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opióides, inibiu o efeito antinociceptivo da morfina, contudo não foi capaz de inibir a antinocicepção causada pelo EE de *Melissa officinalis*.

O presente estudo confirmou que a via L-arginina - óxido nítrico está envolvida na ação antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis*. Esta conclusão deriva do fato de que o pré-tratamento dos animais com o substrato para a NOS, a L-arginina, numa dose em que não produziu nenhum efeito "per se" no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato, reverteu significativamente a atividade antinociceptiva causada pelo inibidor da sintase

do NO, L-NOARG, assim como a antinocicepção causada pelo EE. Ao contrário, o pré-tratamento dos animais com o isômero inativo da L-arginina, a D-arginina, não reverteu o efeito da L-NOARG e do EE no modelo do glutamato. Por isso, o EE de *Melissa officinalis* deve exercer seu efeito antinociceptivo por atuar, pelo menos em parte, inibindo a sintase do óxido nítrico (HORVÁTH *et al.*, 1999; FAIRBANKS *et al.*, 2000; ARICIOGLU-KARTAL *et al.*, 2003; HOU *et al.*, 2003; KARADAG *et al.*, 2003, ÖNAL *et al.*, 2003).

Este trabalho demonstrou que o EE de *Melissa officinalis* exerce seu efeito antinociceptivo, pelo menos em parte, pela via colinérgica, tanto por receptores nicotínicos como por receptores muscarínicos, visto que tanto a mecamilamina (antagonista nicotínico  $\alpha_2\beta_3$  seletivo), quanto a atropina (antagonista muscarínico não seletivo) foram capazes de reverter a antinocicepção causada pelo EE de *Melissa officinalis* e pelos seus respectivos agonistas não seletivos, nicotina e pilocarpina. Corroborando com estes dados, o estudo de Kennedy e colaboradores que demonstrou, através de um estudo de "binding" em tecido do SNC (lobo occipital) de humanos, que o EE de *Melissa officinalis* foi capaz de deslocar a nicotina e a escopolamina de receptores nicotínicos e muscarínicos, respectivamente. A acetilcolina exerce seus efeitos através de receptores nicotínicos (acoplados a canais iônicos) e muscarínicos (ligados à Proteína G) em múltiplos processos fisiológicos. No entanto, está bem estabelecido que os agonistas colinérgicos e também os acetilcolinesterásicos exercem efeitos antinociceptivos por diferentes vias de sinalização, como modulação das vias serotoninérgica e adrenérgica descendentes e aumento da secreção de neurotransmissores inibitórios como GABA e glicina (JONES & DUNLOP, 2007). Os efeitos modulatórios sobre o

sistema GABAérgico ocorrem principalmente via receptores GABA<sub>B</sub>, que aumentam a condutância ao potássio e diminuem a condutância ao cálcio nos nociceptores (LI *et al.*, 2002).

Uma vez esclarecido que o EE de *Melissa officinalis* apresenta efeito em modelos de dor aguda surgiu a dúvida se apresentaria também o mesmo efeito na dor crônica. Desta forma, o extrato mencionado foi testado em animais submetidos à ligadura parcial do nervo ciático, tendo em vista que este modelo envolve tanto os mediadores químicos que participam da nocicepção neurogênica quanto da inflamatória. Realmente, os resultados obtidos neste modelo demonstram que o EE de *Melissa officinalis* inibiu significativamente a alodínia mecânica por até 12 horas após a sua administração. Além disso, os resultados comprovam que o EE administrado uma vez ao dia, durante 7 dias, reduziu significativamente a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático. Este efeito foi evidente até o 7º dia de tratamento (inibição de 100%). Contudo, quando o tratamento foi suspenso por 3 dias, a alodínia mecânica foi restabelecida. No 11º dia, o tratamento dos animais com o EE foi reiniciado e observou-se que o mesmo foi capaz de reduzir a alodínia mecânica semelhante ao tratamento agudo, indicando que o EE parece não apresentar efeito cumulativo, nem induzir tolerância. Sabe-se que as sensações de dor estão normalmente relacionadas à ativação de neurônios aferentes primários não mielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras A $\delta$ ), que são normalmente silenciosos na ausência de estimulação, e respondem melhor aos estímulos potencialmente nocivos. Entretanto, após a lesão no nervo periférico, estes neurônios tornam-se anormalmente sensíveis e desenvolvem atividade

espontânea patológica (BARON, 2006). A atividade espontânea ectópica seguida pela lesão do nervo é produzida pelo aumento do número de canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem (LUO *et al.*, 2001; HAINS *et al.*, 2004), estes últimos facilitando a liberação de glutamato e SP. Além disso, sabe-se que há um aumento da produção de óxido nítrico (GARRY *et al.*, 2000) sugerindo, desta forma, uma possível relação do efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis* com o sistema glutamatérgico e com a via L-arginina-óxido nítrico.

Já foi confirmado que pacientes que apresentam dor também são acometidos por quadros de hipersensibilidade (hipernocicepção), tais quais a hiperalgesia e a alodínia (MILLAN, 1999). A hiperalgesia é um estado caracterizado pela diminuição do limiar nociceptivo e está associada à resposta nociceptiva em vários modelos de nocicepção (térmica, química e mecânica), tem origem no aumento da secreção de mediadores inflamatórios, e estes tornam as fibras sensoriais nociceptivas mais sensíveis (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Neste estudo investigou-se também o efeito do EE de *Melissa officinalis* na hiperalgesia causada por BK, PGE<sub>2</sub> e PMA. Dados na literatura demonstram que vários mediadores pró-inflamatórios causam hipernocicepção por sua ação sobre proteínas quinases, especialmente PKA, PKC e quinases ativadas por mitógenos (SCHOLZ & WOOLF, 2002). Sabe-se, por exemplo, que em nociceptores a bradicinina se liga a receptores B<sub>2</sub>, ativando diretamente a PKC e indiretamente a PKA (FERREIRA *et al.*, 2004, 2005). Conhece-se também que a Prostaglandina E<sub>2</sub> atua por modular a corrente em canais iônicos e ativando diretamente a PKA (PORTANOVA *et al.*, 1996; KHASAR *et al.*, 1999; TREBINO

*et al.*, 2003). O PMA por sua vez exerce seus efeitos diretamente sobre a PKC, e desta forma modulando a liberação de diversos outros mediadores pró-inflamatórios (SZALLASI & BLUMBERG, 1993; FERREIRA *et al.*, 2005; TSUCHIYA *et al.*, 2005). Neste contexto, os resultados sugerem que o EE de *Melissa officinalis* inibe a hiperalgesia induzida por diferentes agentes flogísticos por inibir PKA e PKC. Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese.

Uma vez confirmada essa atividade do EE de *Melissa officinalis* sobre mediadores inflamatórios e tendo em vista sua utilização em medicamentos para afecções inflamatórias do trato digestivo, decidiu-se constatar a atividade do EE sobre um modelo inflamatório do sistema gastrointestinal utilizando-se do modelo de colite induzida pelo ácido acético (SADREI *et al.*, 2003; SIMMEN *et al.*, 2006; SCHEMMAN *et al.*, 2007). Conforme o esperado, o EE mostrou efeitos positivos também neste modelo, mostrando-se capaz de reduzir os danos e o peso do cólon quando comparado ao controle. O mecanismo de ação não está bem estabelecido, especula-se, no entanto, que não seja uma ação semelhante à dexametasona, uma vez que o EE não produz efeitos de diminuição do peso do baço dos animais, característico de antiinflamatórios esteroidais que atuam por inibir a resposta imune (COE & LUBACH, 2005).

No entanto, parte dos fármacos que promovem o alívio da dor pode contrometer processo de memória, uma vez que interagem com o sistema glutamatérgico, em especial com o receptor NMDA, que também está envolvido na formação de novas memórias.

Trabalhos demonstraram que o EE de *Melissa officinalis* seria um potencial agente no tratamento de demências tais como o Alzheimer, por suas propriedades antioxidantes, sedativas e sua ação colinérgica já comprovada (AKHONDZADEH *et al.*, 2003; KENNEDY *et al.*, 2002, 2003; DASTMALCHI *et al.*, 2007). Tendo em vista os dados supracitados, o EE de *Melissa officinalis* foi testado no modelo da esQUIVA inibitória para avaliação de uma suposta atividade facilitatória na memória. Este estudo mostrou que o EE de *Melissa officinalis*, quando administrada uma hora antes do treino por via oral, é capaz de facilitar tanto a aquisição quanto a retenção da memória, quando administrada logo após o treino também por via oral. Este efeito facilitatório pode ser observado tanto na memória de curta duração quanto na memória de longa duração. É importante mencionar ainda que este efeito é dissociado de qualquer efeito sedativo ou relaxante inespecífico, como foi comprovado pelo teste de campo aberto realizado nos animais.

Além disso, o EE de *Melissa officinalis* demonstrou atuar sobre o sistema glutamatérgico e colinérgico, além de sobre a via L-arginina- óxido nítrico, que além de atuarem como vias modulatórias da nocicepção atuam também como vias modulatórias da memória (CAMMAROTA *et al.*, 2005).

É conhecido que a injeção sistêmica do antagonista do receptor NMDA, MK-801, reduz o comportamento nociceptivo induzido por aminoácidos excitatórios injetados intratecalmente (GADOTTI *et al.*, 2006). No entanto, também é conhecido que o MK-801 leva a prejuízos na memória (ROESLER *et al.*, 1999). Desta forma, quando os animais pré-tratados com MK-801 foram tratados com EE de *Melissa officinalis* e submetidos à esQUIVA inibitória observou-se uma reversão total do efeito facilitador do EE. O que leva a crer

que os efeitos facilitatórios sobre a memória do EE de *Melissa officinalis*, devem-se, ao menos em parte, à interação com o sistema glutamatérgico. Uma vez que o referido sistema tem grande participação nos mecanismos de formação de LTP, pois o estímulo inicial se dá através dos receptores AMPA, que quando despolarizados provêm o desbloqueio dos canais NMDA. Estes últimos quando abertos geram uma maciça entrada de íons cálcio os quais ativam inúmeras proteínas quinases, que fosforilam receptores AMPA internalizados fazendo com que eles se externalizem. Além disso, o aumento da concentração intracelular de íons cálcio ativa a sintase do óxido nítrico, que clivará L-arginina em citrulina e NO. O NO rapidamente se difunde para a célula pré-sináptica reforçando ainda mais a sinapse e fazendo com que ocorra uma maior liberação de glutamato na fenda (JI *et al.*, 2003; WANG, HU & TSIEN, 2006).

Outro mecanismo bastante envolvido com a formação e manutenção de memórias é a via L-arginina óxido nítrico. Estudos demonstram que os inibidores da sintase do óxido nítrico, como o L-NAME, têm efeito deletério sobre a memória (EDWARDS & RICKARD, 2006; KHAVANDGAR *et al.*, 2003). Este estudo demonstrou que, ao menos em parte, os efeitos facilitatórios da memória do EE de *Melissa officinalis* acontecem com a participação da via L-arginina-óxido nítrico. Isso pode ser sugerido porque o pré-tratamento com L-NAME preveniu os efeitos facilitatórios da memória exercidos pelo referido extrato.

Além disso, demonstrou-se também, que ao menos em parte, o efeito do EE de *Melissa officinalis* sobre a memória é devido ao sistema colinérgico, tanto via receptores nicotínicos quanto muscarínicos, uma vez que os pré-

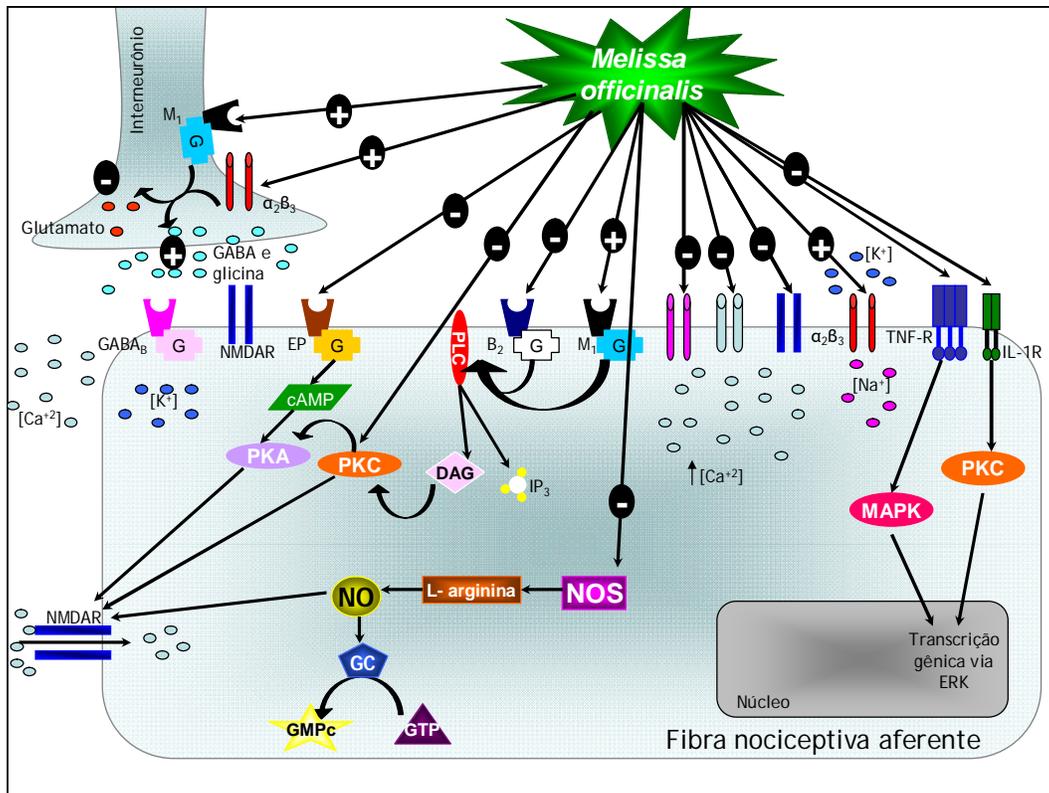
tratamentos com mecaminolina (antagonista nicotínico  $\alpha_2\beta_3$ ) e atropina (antagonista muscarínico não específico) foram capazes de reverter o efeito do extrato. Efeito este devido provavelmente a modulação da atividade glutamatérgica e da via L-arginina-óxido nítrico (GOLD, 2003; MIRANDA *et al.*, 2003).

Assim, vê-se que o EE de *Melissa officinalis* é capaz de exercer ações antinociceptivas e facilitatórias da memória, no entanto, parece que essas ações são dissociadas entre si. Uma vez que dados presentes na literatura demonstram que normalmente há uma relação inversamente proporcional entre as atividades antinociceptivas e facilitatórias da memória. Especialmente quando há envolvimento do sistema glutamatérgico na modulação da dor por alguma droga espera-se que esta leve a prejuízos na memória. Uma vez que a formação e evocação de memórias dependem de intensa ativação do sistema glutamatérgico e da via L-arginina-óxido nítrico e a antinocicepção requer uma inativação dos mesmos sistemas (HEALE & HARLEY, 1990; CASTELLANO *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2002; HLINAK & KREJRI, 2002; BAST *et al.*, 2003).

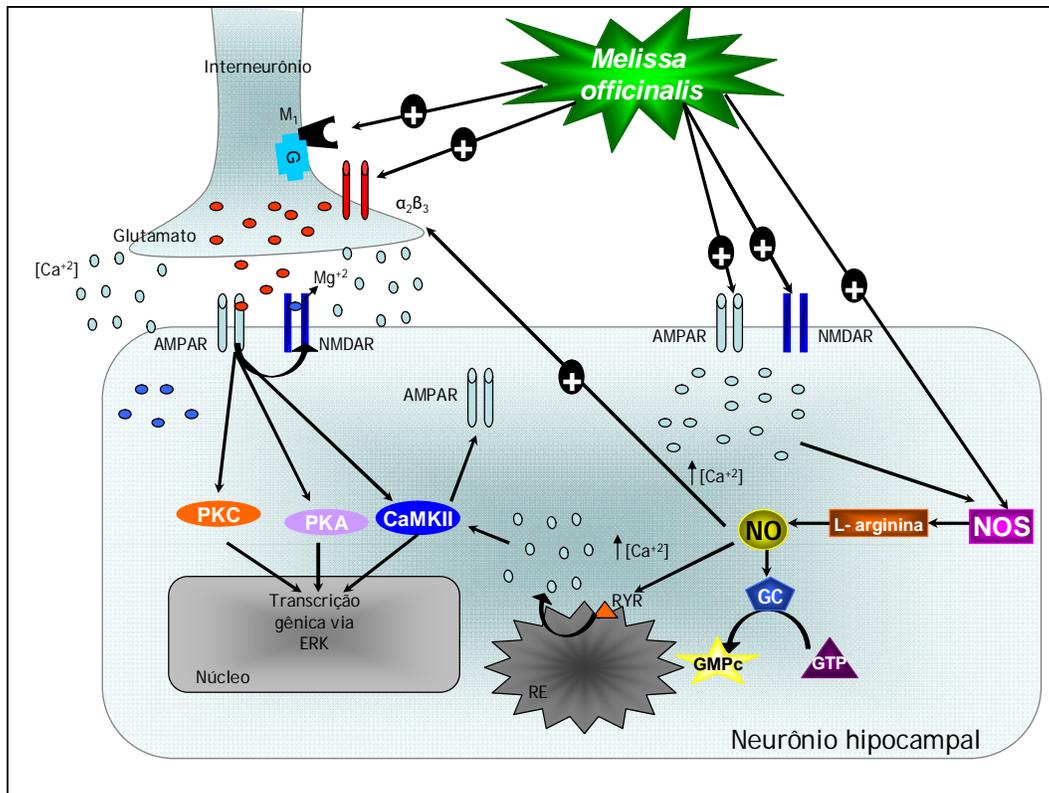
Desta forma, os dados obtidos neste estudo são importantes, pois demonstram não só a atividade antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis* via antagonismo do sistema glutamatérgico, como também evidencia que a atividade facilitatória da memória se dá por ativação do sistema glutamatérgico. Uma hipótese que pode explicar este fato intrigante seria a participação de compostos diferentes para cada tarefa. Presume-se que o ácido rosmarínico, presente em grandes quantidades no extrato, pode ser um dos responsáveis pela atividade antinociceptiva. Especula-se que as substâncias

encontradas no EE de *Melissa officinalis* que beneficiam a memória sejam os monoterpenos, como o citral, por sua ação inibitória sobre a acetilcolinesterase (SALAH & JÄGER, 2005).

Em síntese, pode-se observar nas figuras 29 e 30 que a administração sistêmica (v.o.) do EE de *Melissa officinalis* (1) produziu inibição da nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos; (2) causou inibição significativa da nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela formalina e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos; (3) foi eficaz em inibir a alodínia resultante de constrição parcial do nervo ciático em camundongos; (4) reverteu a hiperalgesia térmica e mecânica causada por BK, PGE<sub>2</sub> e PMA em ratos; (5) preveniu danos no cólon de camundongos no modelo de colite induzida por ácido acético; (6) é capaz de prevenir o efeito pró-nociceptivo da administração intratecal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ; (7) inibiu a resposta nociceptiva causada por NMDA, AMPA e Cainato, mas não pelo trans-ACPD e pela SP; (8) não causou nenhuma alteração motora significativa no teste do campo aberto; (9) teve a antinocicepção no modelo do glutamato revertida pelo pré-tratamento com L-NOARG, mecamilamina e atropina, mas não pela naloxona; (10) exerceu efeito facilitatório sobre a memória de ratos no modelo da esQUIVA inibitória (Figura 30); (11) teve os efeitos facilitatórios sobre a memória revertidos pelo pré-tratamento com MK-801, L-NAME, mecamilamina e atropina.



**Figura 29:** Prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do EE de *Melissa officinalis*. O EE de *Melissa officinalis* parece exercer sua atividade antinociceptiva por interagir com os sistemas: glutamatérgico (através dos receptores NMDA, AMPA e Cainato) e colinérgico (através de receptores nicotínicos e muscarínicos), além da via L-arginina-óxido nítrico. GABA<sub>B</sub>- receptor GABAérgico do tipo B, EP - receptor de PGE<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> - receptor de bradicinina, M1 - receptor muscarínico tipo 1 ou neural, α<sub>2</sub>β<sub>3</sub> - receptor nicotínico predominantemente neuronal, TNF-R - receptor de TNF-α; IL-1R - receptore de IL-1β, PKA - proteína quinase A, PKC - proteína quinase C, MAPK - quinase ativada por mitógenos, cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico, NOS - sintase de óxido nítrico, NO - óxido nítrico, GC - guanilato ciclase, GMP<sub>c</sub> - Monofosfato cíclico de 3'5' - guanosina, GTP - guanosina-5'-trifosfato, [Ca<sup>2+</sup>] - concentração de cálcio, IP<sub>3</sub> - inositol 1,4,5- trifosfato, DAG - diacilglicerol, NMDAR - receptor glutamatérgico tipo NMDA, AMPAR - receptor glutamatérgico tipo AMPA (+) ativação, (-) inibição.



**Figura 30:** Prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade facilitatória da memória do EE de *Melissa officinalis*. O qual parece exercer sua atividade por interagir com os sistemas :glutamatérgico (através dos receptores NMDA e AMPA) e colinérgico (através de receptores nicotínicos e muscarínicos), além da via L-arginina-óxido nítrico. M1 - receptor muscarínico tipo 1 ou neural,  $\alpha_2\beta_3$  - receptor nicotínico predominantemente neuronal, PKA - proteína quinase A, PKC - proteína quinase C, CaMKII - Cálcio/calmodulina quinase II, NOS - sintase de óxido nítrico, NO - óxido nítrico, GC - guanilato ciclase,  $GMP_c$  - Monofosfato cíclico de 3'5' - guanosina, GTP - guanosina-5'-trifosfato, RE - retículo endosarcoplasmático, RYR - receptor de rianodina,  $[Ca^{2+}]$  - concentração de cálcio, NMDAR - receptor glutamatérgico tipo NMDA, AMPAR - receptor glutamatérgico tipo AMPA,  $Mg^{+2}$  - íon magnésio, (+) ativação, (-) inibição.

Em um estudo de 1998, Carnat e colegas demonstraram que um dos compostos mais abundantes nas folhas de *Melissa officinalis* é o ácido rosmarínico, e estima-se que o EE de *Melissa officinalis* contenha 2 a 5% desta substância. Ainda este mesmo estudo estimou que em uma xícara de chá feito de folhas secas de *Melissa officinalis* encontram-se 60 a 180 mg de ácido rosmarínico. Suas principais atividades são: adstringente, antioxidante,

antiinflamatório, antimutagênico, antibacteriano e antiviral (PETERSEN & SIMMOND, 2003). Sabe-se que o ácido rosmarínico é capaz de proteger contra a perda de memória induzida por peptídeo  $\beta$ -amilóide em camundongos (ALKAM et al., 2007). No entanto, estudos recentes indicam que o ácido rosmarínico não tem qualquer efeito sobre a memória no modelo da esQUIVA inibitória em ratos (PEREIRA et al., 2005). O que leva a crer que a ação do ácido rosmarínico seja diretamente sobre o peptídeo e não sobre a formação da memória em si.

Diante do acima descrito, optou-se por verificar também, de forma sucinta a atividade antinociceptiva no ácido rosmarínico, submetendo-o ao modelo de nocicepção induzida pelo glutamato, onde foi verificado que ele exerce, na maior dose utilizada, uma inibição de aproximadamente 65%, inibição esta muito semelhante à produzida pela maior dose do EE de *Melissa officinalis*. Além disso, é importante mencionar que, se tratando de  $DI_{50}$ , o ácido rosmarínico foi cerca de setenta e quatro vezes mais potente que o EE de *Melissa officinalis*. Desta forma, pode-se supor que ao menos em parte o efeito antinociceptivo do EE de *Melissa officinalis* é devido ao ácido rosmarínico.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- O EE da *Melissa officinalis* apresenta efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, glutamato e formalina em camundongos;
- O EE da *Melissa officinalis* é eficaz em inibir a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos;
- A hiperalgesia térmica e mecânica, geradas por agentes flogísticos tais como BK, PGE<sub>2</sub> e PMA é inibida pelo EE de *Melissa officinalis*, em ratos;
- O pré-tratamento com EE de *Melissa officinalis* previne os danos no cólon no modelo de colite induzida por ácido acético em camundongos, e essa ação parece não ser imune dependente;
- O EE de *Melissa officinalis* é capaz de inibir o efeito pró-nociceptivo das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  administradas pela via intratecal em camundongos;
- Os sistemas glutamatérgico, colinérgico e a via do óxido nítrico parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva do EE da *Melissa officinalis*;
- O EE da *Melissa officinalis* não causa déficit na performance motora avaliada no teste do campo aberto em camundongos e em ratos;

- O Ácido Rosmarínico, substância encontrada em grande quantidade no EE de *Melissa officinalis*, é capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção de glutamato;
- O EE da *Melissa officinalis*, exerce efeito facilitatório sobre a aquisição e retenção da memória de curta e longa duração em ratas, no modelo de esquiva inibitória;
- O efeito do EE de *Melissa officinalis* se dá, pelo menos em parte, pelos sistemas glutamatérgico, colinérgico e também pela via da L-arginina-óxido nítrico;
- Estes dados fornecem, pelo menos em parte, a fundamentação científica para a utilização etnofarmacológica do extrato de *Melissa officinalis*;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1: 9-19, 1987.

AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, 41: 309-321, 1990.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RÉMÉSY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidey-inositol-3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol**, 53: 1649-1657, 1997.

AKHONDZADEH,S.; NOROOZIAN, M.; MOHAMMADI,M.; OHADINIA,S.; AMSHIDI, A.H.; KHANI, M. *Melissa officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized, placebo controlled trial. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 74: 863-866, 2003.

ALLAHVERDIYEV, A.; DURAN, N.; OZGUVEN, M.; KOLTAS, S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpex simplex* virus type-2. **Phytomedicine**, 11: 657-661, 2004.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.

ARICIOGLU-KARTAL, F.; KORCEGEZ, E.; BOZKURT, A.; OZYALCIN, S. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1009: 105-115, 2003

BARROS, D.M.; RAMIREZ, M.R.; IZQUIERDO, I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdale in rats. **Neurobiol Learn Mem.**, 83:113-118, 2005.

BAST, T., ZHANG, W.N., FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. **Hippocampus**, 13: 657-675, 2003.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, pp.775-807.

BEERI, R.; ANDRES, C.; LEV-LEHMAN, E.; TIMBERG, R.; HUBERMAN, T.; SHANI, M.; SOREQ, H. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. **Curr Biol.**, 5: 1063-1073, 1995.

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

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, 969: 110-6, 2003.

BERNABEU, R.; BEVILAQUA, L.; ARDENGHI, P.; BROMBERG, E.; SCHMITZ, P.; BIANCHIN, M.; IZQUIERDO, I.; AND MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 94: 7041-7046, 1997.

BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. 53: 1-9, 1997.

BEVILAQUA, L.R.; KERR, D.S.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA. Inhibition of hippocampal JunN-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **Eur J Neurosci.**, 17: 897-902, 2003.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM E.S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol.**, 17: 592-604, 2006.

BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; KARABULUT-BULAN, O.; YESILYAPRAK, B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on the liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. **J Ethnopharmacol**, 99: 391-398, 2005.

BORTOLOTTI, Z.A.; NISTICO, R.; MORE, J.C.; JANE, D.E.; COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors and Mossy fiber LTP. **Neurotoxicology**, 26: 769-777, 2005.

BOXALL, S.J.; BERTHEIE, A.; TOLLE, T.R.; ZIEGLGANSBERGER, W.; URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport**, 9: 1201-1203, 1998.

BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J. Physiol.**, 190: 541-562, 1967.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, 33: 179-89, 2000.

CAMMAROTA, M.; BARROS, D.M.; VIANNA, M.R.M.; BEVILAQUA, L.R.M.; COITINHO, A.; SZAPIRO, G.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. The transition from memory retrieval to extinction. **A Acad Bras Ciênc**, 76: 573-582, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; BARROS, D.M.; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval and Extinction of Memory. **Cell Mol Neurobiol**, 25: 465-474, 2004b.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; RAMIREZ, M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiol Learn Mem.**, 84: 25-32, 2005.

CARLTON, S.M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, 790: 160-169, 1998.

CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids. **Curr Opin Pharmacol.**, 1: 52-56, 2001.

CARNAT, A.P.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; LAMAISON, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. **Pharm Acta Helv.**, 72: 301-305, 1998.

CHAPLAN, S.R.; MALBERRG, A.B.; YAKSH, T.L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 280: 829-838, 1997.

CASTELLANO, C., CESTARI, V., CIAMEI, A. NMDA receptors and learning and memory processes. **Curr Drug Targets**, 2: 273-283, 2001.

CHAPMAN, C.R.; GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, 353: 2233-2237, 1999.

CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52: 259-285, 1993.

COE, C.L.; LUBACH, G.R. Developmental consequences of antenatal dexamethasone treatment in nonhuman primates. **Neurosci Biobehav Rev.**, 29: 227-235, 2005.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res Rev.**, 24: 28-66, 1997.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, J.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, 32: 295-310, 1968.

COOPER, S.J. Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. **Neurosci Biobehav Rev.**, 28: 851-874, 2005.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72: 359-371, 2005.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds) **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, Edinburgh. p.183-214, 1999.

DASTMALCHI, K.; DORMAN H.J.D.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I. HILTUNEN, R. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **LWT - Food sci tech**. In press, 2007.

DAVIES, S.N.; LODGE, D. Evidence for involvement N-methylaspartate receptors in "wind-up" of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res.**, 424: 402-406, 1987.

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

DUARTE, I.D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Res**. 21: 341-343, 1988.

EDWARDS, T.M.; RICKARD, N.S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. **Neurosci Biobehav Rev.**, 31: 413-425, 2007.

ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J Ethnopharmacol.**, 51: 111-120, 1996.

FAIRBANKS, C.A.; SCHREIBER, K.L.; BREWER, K.L.; YU, C.G.; STONE, L.S.; KITTO, K.F.; NGUYEN, H.O.; GROCHOLSKI, B.M.; SHOEMAN, D.W.; KEHL, L.J.; REGUNATHAN, S.; REIS, D.J.; YEZIERKI, R.P.; WILCOX, G.L. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 10584-10589, 2000.

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

FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; MORI, M.A.S.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knockout mice. **J. Neurosci.**, 25: 2405-2412, 2005.

FERREIRA, J.; SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, 141: 787-794, 2004.

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

FERREIRA, A.; PROENÇA, C.; SERRALHEIRO, M.L.M.; ARAÚJO, M.E.M. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **J Ethnopharmacol.**, 108: 31-37, 2006.

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

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

GADOTTI, V.M.; TIBOLA, D.; PASZCUK, A.F.; RODRIGUES, A.L.S.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res.**, 1093: 116-122, 2006.

GALLIN, J.I.; FLETCHER, M.P.; SELIGMANN, B.E.; HOFFSTEIN, S.; CEHRS, K.; MOUNESSA, N. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. **Blood**, 59: 1317-1329, 1982.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTE, S.; GRATACAP, M.P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and inhibition of PKC and PI-3K. **Gen Pharmacol.**, 32: 279-286, 1999.

GARCIA, T.J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Engl.J. Med.**, 353: 429-430, 2005.

GARRY, M.G.; WALTON, L.P.; DAVIS, M.A. Capsaicin-evoked release of IR calcitonin gene-related peptide from the spinal cord is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP. **Brain Res.**, 861: 208-219, 2000.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Ann Rev Physiol.**, 57: 683-706, 1995.

GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; ALEXANDRE, M.M. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacol Res.**, 50: 477-480, 2004.

GOLD, P.E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiol Learn Mem.**, 80: 194-210, 2003.

GOULD, T.J., MCCARTHY, M.M., KEITH, R.A. MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. **Behav Pharmacol.**, 13: 287-294, 2002.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs.**, 7: 297-312, 2006.

GURPREET, K.D.; STEPHEN, S.G.F. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. **Pharmacol Therap.**, 111: 260-271, 2006.

HAINS, B.C.; SAAB, C.Y.; KLEIN, J.P.; CRANER, M.J.; WAXMAN, S.G. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. **J Neurosci.**, 24: 4832-4839, 2004.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, 32, 77 - 88, 1998.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, 96: 67-202, 2002.

HAWKINS, R.D.; KANDELL, E.R.; BAILEY, C.H. Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. **Biol. Bull.** 210: 174-191, 2006.

HEALE, V., HARLEY, C. MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. **Pharmacol Biochem Behav.**, 36: 145-149, 1990.

HEITZ, A.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; CARNAT, A.P.; LAMAISON, J.L. Leotelin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. **Fitoterapia**, 71: 201-202, 2000.

HERODEZ, S.S.; HADOLIN, M.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chemistry**, 80: 275-282, 2003.

HERRERO, J.F.; LAIRD, J.M.A.; LOPEZ-GARCIA, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog Neurobiol.**, 61: 169-203, 2000.

HLINAK, Z., KREJCI, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res.**, 131: 221-225, 2002.

HORVÁTH, G.; KÉKESI, G.; DOBOS, I.; SZIKSZAY, M.; KLIMSCHA, W.; BENEDEK, G. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 368: 197-204., 1999.

HOU, S.W.; QI, J.S.; ZHANG, Y.; QIAO, J.T. Spinal antinociceptive effect of agmatine and tentative analysis of involved receptors: study in an electrophysiological model of rats. **Brain Res.** 968: 277-280, 2003.

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

HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol.**, 67: 313-6, 1980.

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

IUVONE, T.; DE FILIPPIS, D.; ESPOSITO, G.; D'AMICO, A.; IZZO, A. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cell from amyloid- $\beta$  peptide-induced neurotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther.**, 317: 1143-1149, 2006.

IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; VIANNA, M.R.M.; COITINHO, A.; DAVID E SILVA, T.; CHOI, H.; MOLETTA, B.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Molecular Pharmacological dissection of Short- and Long-Term memory. **Cell Mol Neurobiol.**, 22: 269-287, 2002.

JAFFE, J.H.; MARTIN, W.R. Opioid agonists and antagonists, in: Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Vol. 9, eds. A.G. GILMAN, T.W. RALL, A.S. NIES AND P. TAYLOR (Macmillan, New York) p. 485, 1990.

JI, R.R.; KOHNO, T.; MOORE, K.A.; WOOLF, C.J. Central pain sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends Neurosci.**, 26: 696-705, 2003.

JI, R.R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction on nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis.**, 8: 1-10, 2001.

JONES, P.G.; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**. In press, 2007.

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

KAHVECI, N.; GULEC, G.; OZLUK, K. Effects of intracerebroventricularly-injected morphine on anxiety, memory retrieval and locomotor activity in rats: involvement of vasopressinergic system and nitric oxide pathway. **Pharmacol Biochem Behav.**, 85: 859-867, 2006.

KAMIYA, H.; NAKAMURA, J.; HAMADA, Y.; NAKASHIMA, E.; NARUSE, K.; KATO, K.; YASUDA, Y.; HOTTA, N. Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, 19:131-139, 2003.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science**. 4 ed. New York: Elsevier, 2000.

KASTER, M.P.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES, A.L. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res Bull.**, 67: 53-61, 2005.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KUSILIC, T.; JUKIE, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food chemistry**, 94: 550-557, 2006.

KARADAG, H.C.; ULUGOL, A.; TAMER, M.; IPCI, Y.; DOKMECI, I. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. **Neurosci. Lett.** 339: 88-90, 2003.

KAUFFMAN, G.B.; CHOOLJIAN, S.H. Synthesis of a genius. **Chemistry & Industry**, 23: 775-775, 2000.

KENNEDY, D.O.; SCHOLEY, A.B.; TILDESLEY, N.T.J.; PERRY, E.K.; WESNES, K.A. Modulation of mood and cognitive performance following administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). **Pharmacol Biochem Behav.**, 72: 953-964, 2002.

KENNEDY, D.O.; WAKE, G.; SAVELEV,S.; TILDESLEY, N.T.J.; PERRY, E.K. WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) with human CNS nicotinic and muscarínico receptor-binding properties. **Neuropsychopharmacology**, 28: 1871-1881, 2003.

KHASAR, S.G., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. Epinephrine produces a betaadrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J. Neurophysiol.**, 81: 1104-1112, 1999.

KHAVANDGAR, S.; HOMAYOUN, H.; ZARRINDAST, M.R. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. **Psychopharmacology**, 163: 291-296, 2003.

KIM, J.H.; HA, H.C.; LEE, M.S.; KANG, J.I.; KIM, H.S.; LEE, S.Y.; PYUN, K.H.; SHIM, I. Effect of *Tremella fuciformis* of the Neurite Outgrowth of PC12h Cells and the Improvement of Memory in Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, 30: 708-714, 2007.

KIM, K.S.; LEE, K.W.; IM, J.Y.; YOO, J.Y.; KIM, S.W.; LEE, J.K.; NESTLER, E.J.; HAN, P.L. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 103: 3908-3913, 2006.

KNOX, A.J. How prevalent is aspirin induced asthma? **Thorax**, 57: 565-566, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** 18: 412, 1959.

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

LOMBARDINO J.G.;LOWE III, J.A. The role of the medicinal Chemist in drug discovery - then and now. **Nat Rev Drug Discov.**, 2004, vol 3, p. 853-862.

LØMO, T. The discovery of long-term potentiation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 358: 617-320, 2003.

LUO, Z.D.; CHAPLAN, S.R.; HIGUERA, E.S.; SORKIN, L.S.; STAUDERMAN, K.A.; WILLIAMS, M.E.; YAKSH, T.L. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **J Neurosci.**, 21: 1868-1875, 2001.

LYNCH, M. Long-Term potentiation and memory. **Physiol Rev**, 84: 87-136, 2004.

MacFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.**, 75: 1-19, 1997.

MacMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, 192: 444- 462, 2005.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain**, 76: 215-22, 1998.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J Neurosci.**, 15: 2768-76, 1995.

MARVIZON, J.C.; MCROBERTS, J.A.; ENNES, H.S.; SONG, B.; WANG, X.; JINTON, L.; CORNELIUSSEN, B.; MAYER, E.A. Two *N*-methyl-d-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. **J Comp Neurol.**; 446: 325-241, 2002.

MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is noninflammatory and non-ulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 3228-3232, 1994.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med.**, 348: 1243-1255, 2003.

MENDES, G.L.; SANTOS, A.R.S.; MALHEIROS A., FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 292: 164-172, 2000.

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **J Pharmacol Exp Ther.**, 316: 789-796, 2006.

MIDDLETON, E.Jr.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol. Rev.**, 52: 673-751, 2000.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.**, 57: 1-164, 1999.

MIRANDA, M.I.; FERREIRA, G.; RAMÍREZ-LUGO, L.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. Role of cholinergic system on the construction of memories: Taste memory encoding. **Neurobiol Learn Mem.**, 80: 211-222, 2003.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol.**, 102: 198-202, 1991.

MOORE, P.K.; WALLACE, P.; GAFFEN Z.; HART, S.L.; BABBEDGE, R.C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br. J. Pharmacol.** 110: 219-224, 1993.

MÜLLER, S.F.; KLEMENT, S. A combination of valeriana and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. **Phytomedicine**, 13: 383-387, 2006.

NAGRA, R.M., BECHER, B.; TOURTELLOTTE, W.W.; ANTEL, J.P.; GOLD, D.; PALADINO, T.; SMITH, R.A.; NELSON, J.R.; REYNOLDS, W.F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.**, 78: 97-107, 1997.

NETTO, C.A.; OLIVEIRA, C.B.; GIANLUPI, A.; QUILLFELDT, J. Effect of atropine and propranolol on retrieval enhancement by a novel experience or by injection of beta-endorphin prior testing in rats. **Braz Med Biol Res**, 23: 59-63, 1990.

NEUGEBAUER, V. Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. **Trends Neurosci.**, 24: 550-552, 2001.

ODDO, S.; LA FERLA, F.M. The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. **J Physiol Paris**, 99: 172-179, 2006.

ÖNAL, A.; DELEN Y.; ULKER, S.; SOYKAN, N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. **Life Sci.** 73: 413-428, 2003.

OTSUKA, M. & YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**, 73: 229-308, 1993.

OTUKI, M.F.; VIERA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol**, 507: 253-259, 2005.

OUBRÉ, A.Y.; CARLSON, T.J.; KING, S.R.; REAVEN, G.M. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for treatment of NIDDM. **Diabetologia**, 40: 614-617, 1997.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.**, 54: 581-618, 1998.

PALECEK, J.; NEUGEBAUER, V.; CARLTON, S.M.; IYENGAR, S.; WILLIS, W.D. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. **Pain**, 111: 151-161, 2004.

PASERO, C.; PAICE, J.; McCAFFERY, M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. Em: McCaffery & Pasero, C. (eds). **Pain Clinical Manual St. Louis, MO**: Mosby, pp. 15-34, 1999.

PASTERNAK, G. W. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. **J Am Med Assoc.**, 259: 1362, 1988.

PEREIRA, P.; TYSCA, D.; OLIVEIRA, P.; DA SILVA BRUM, L.F.; PICADA, J.N.; ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacol Res**, 52: 199-203, 2005.

PERRY, N.; COURT, G.; BIDET, N.; COURT, J.A.; PERRY, E.K. Cholinergic transmitter related activities in extracts of European herbs: potential in dementia therapy. **Int J Geriatr Psychiatry**, 11: 1063-1069, 1996.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxiup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 83: 90-9, 2006.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M.S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, 62: 121-125, 2003.

PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther.**, 71: 313-324, 1996.

POCKETT, S. Spinal cord sympathetic plasticity and chronic pain. **Anesth Analg.**, 80: 173-179, 1995.

POPOV, S.V.; OVODOVA, R.G.; MARKOV, P.A.; NIKITINA, I.R.; OVODOV, Y.S. Protective effect of Comaruman, a Pectin of cinquefoil *Comarum palustre* L.; on acetic acid-induced colitis in mice. **Dig Dis Sci.**, 51: 1532-1537, 2006.

PORTANOVA, J.P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S.A.; ISAKSON, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J Exp Med.**, 184:883-91, 1996.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, 2002, vol. 25, p. 45-61.

RANDALL, L.O.; SELLITO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch Int. Pharmacodyn.**, 111: 409-419, 1957.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

RAMER, M.S.; THOMPSON, S.W.; MacMAHON, S.B. Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. **Pain**, 6: 111-120, 1999.

RAYMOND, C.R. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the 'long' in long-term potentiation. **Trends Neurosci.**, 30: 167-175, 2007.

REICHERT, J.A.; DAUGHTERS, R.S.; RIVARD, R.; SIMONE, D.A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**, 89: 221-227, 2001.

REIS, E.A.; OLIVEIRA, L.S.; LAMERS, M.L.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain Res.**, 951: 151-157, 2002.

REN, K. & DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, 100:1-6, 2002.

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

RIBEIRO, M.A.; BERNARDO-GIL, M.G.; ESQUÍVEL, M.M. Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **J Supercrit Fluids**, 21: 51-60, 2001.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol.**, 60: 404-15, 2001.

RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in openfield and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.**, 79: 150-6, 1996.

ROESLER, R.; VIANNA, M.R.M.; DE-PARIS, F.; QUEVEDO, J. Memory-Enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. **Neurobiol Learn Mem.**, 72: 252-258, 1999.

ROSA, K.A.; GADOTTI, V.M.; ROSA, A.O.; RODRIGUES, A.L. CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neurosci Lett.**, 381: 185-8, 2005.

SALAH, S.M.; JÄGER, A.K. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. **J Ethnopharmacol.**, 97: 145-149, 2005.

SANDRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, 74: 445-452, 2003.

SANTOS, A.R.S. & CALIXTO, J.B. Rhutenium red and capzasepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci Lett.**, 235: 73-76, 1997.

SANTOS, A.R.S.; VEDENA, E.M.A.; DE FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.** 47: 302-307, 1998.

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther.**, 289: 417-426, 1999.

SANTOS, A.R.S.; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L.; TIBOLA, D.; PASZCUK, A.F.; NETO, A.; SPINDOLA, H.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.L.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, 48: 1021-34, 2005.

SANTOS-NETO, L.L.; TOLEDO, M.A.V.; MEDEIROS-SOUZA, P.; SOUZA, G.A. The use of Herbal medicine in Alzheimer's disease - A sistematic review. **Advance Access Publication**, 23: 441-445, 2006.

SAVINO, F.; CRESI, F.; CASTAGNO, E.; SILVESTRO, L.; OGGERO, R. A randomized double-blind placebo controlled trial of a standardized extract of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* and *Melissa officinalis* in the treatment of breastfed colicky infants. **Phytother Res**, 19:335-340, 2005.

SAWAMURA, S.; FUJINAGA, M.; KINGERY, W.S.; BELANGER, N.; DAVIES, M.F.; MAZE, M. Opioidergic and adrenergic modulation of formalin-evoked spinal c-fos mRNA expression and nocifensive behavior in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 379: 141-149, 1999.

SWEATT, J. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. **Learn Mem.**, 6: 399-416, 1999.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol Rev.**, 55: 1-20, 2003.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A.R.S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, 43: 340-347, 2002.

SCHEMANN, M.; MICHEL, K.; ZELLER, F.; HOHENESTER, B.; RÜHL, A. Region-specific effects of STW 5 (Iberogast®) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. **Phytomedicine**, 13: 90-99, 2006.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, 8: 93-151, 2006.

SCHOLZ, J.; WOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.**, 5: 1062-1067, 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. **Pain**, 43: 205-18, 1990.

SEOANE, L.M.; AL-MASSADI, O.; CAMINOS, J.E.; TOVAR, S.A.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. Sensory stimuli directly acting at the central nervous system regulate gastric Ghrelin secretion. An ex-vivo organ culture study. **Endocrinology**, in press, 2007.

SHELLEY, A. & CROSS, M.D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc.**, 69: 375-383, 1994.

SIMMEN, U.; KELBER, O.; OKPANYI, S.N.; JAEGGI, R.; BUETER, B.; WEISER, D. Binding of STW 5 (Iberogast®) and its components to intestinal 5-HT, muscarinic M<sub>3</sub>, and opioid receptors. **Phytomedicine**, 13: 51-55, 2006.

STOUGHT, S.; SHOBE, J.L.; CARREW, T.J. Intermediate-term processes in memory formation. **Curr Opin Neurobiol.**, 16: 672-678, 2006.

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

TJØLSEN A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.

TJØLSEN A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). **The Pharmacology of pain**, Vol.130/1., Springer: Verlag, Berlin. p. 1-20, 1997.

TREBINO, C.E.; STOCK, J.L.; GIBBONS, C.P.; NAIMAN, B.M.; WACHTMANN, T.S.; UMLAND, J.P.; PANDHER, K.; LAPOINTE, J.M.; SAHA, S.; POACH, M.L.; CARTER, D.; THOMAS, N.A.; DURTSCHI, B.A.; MCNEISH, J.D.; HAMBOR, J.E.; JAKOBSSON, P.J.; CARTY, T.J.; PEREZ, J.R.; AUDOLY, L.P. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. **Proc Natl Acad Sci.**, 100: 9044-9, 2003.

TSUCHIYA, M.; SAKAKIBARA, A.; YAMAMOTO, M.A. Tachykinin NK1 receptor antagonist attenuates the 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. **Eur J Pharmacol.**, 507:29-34, 2005.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacol. Ther.**, 109: 57-77, 2006.

URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **Eur J Pharmacol.**, 153: 211-220, 1988.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm Res.**, 47: 78-87, 1998.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.**, 46: 295-309, 2004.

VARNEY, M.A.; GEREAU, R.W. Metabotropic glutamate receptor involvement in models of acute and persistent pain: prospects for the development of novel analgesics. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.**, 1: 283-296, 2002.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHSTON, P.R. Antagonism of pain and Hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H., editors. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 50/II,. Springer: Verlag, Berlin. 208-222, 1979.

WADSWORTH, T.L., McDONALD, T.L., KOOP, D.R. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. **Biochem. Pharmacol.**, 62: 963-974, 2001.

WALL, P.D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8, 1999.

WAKE, G.; COURT, J.; PICKERING, A.; LEWIS, R.; WILKINS, R.; PERRY, E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. **J Ethnopharmacol.**, 69: 105-114 ,2000.

WANG, H.; HU, Y.; TSIEN, J.Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. **Prog Neurobiol.**, 79: 123-135, 2006.

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

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

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Pain**, 353: 1959-1964, 1999.

XAGORARI, A.; PAPAPETROPOULOS, A.; MAUROMATIS, A.; ECONOMOU, M.; FOTSIS, T.; ROUSSOS, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated

Phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 296:181-187,2001.

XIAO, H.S.; HUANG, Q.H.; ZHANG, F.X.; BAO, L.; LU, Y.J.; GUO, C.; YANG, L.; HUANG, W.J.; FU, G.; XU, S.H.; CHENG, X.P.; YAN, Q.; ZHU, Z.D.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; HAN, Z.G.; ZHANG, X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 99: 8360-8365, 2002.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. 1ª edição, Chapecó-SC, Argos - Editora Universitária, 2001. cap. 7, p. 297-315.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, 2001, vol. 24, p. 147-152.

ZHANG, X.; BAO, L.; SHI, T.J.; JU, G.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Down-regulation of  $\mu$ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, 82: 223-240, 1998.

ZHU, C.Z.; WILSON, S.G.; IKUSA, J.P.; WISMER, C.T.; GAUVIN, D.M.; LYNCH III, J.J.; WADE, C.L.; DECKER, M.W.; HONORE, P. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. **Eur J Pharm.**, 506: 107-118, 2004.

ZIAKOVÁ, A.; BRADSTETEROVÁ, E.; BLAHOVÁ, E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. **J Chromatogr A**, 983: 271-275, 2003.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**. San Diego: Academic Press, 1999.

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