

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**INVESTIGAÇÃO DAS POSSÍVEIS ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE RAIZ DE *Pouteria ramiflora* Radlk.**

Enéas de Andrade Fontes Júnior

**BELÉM-PA
2004**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Enéas de Andrade Fontes Júnior

**INVESTIGAÇÃO DAS POSSÍVEIS ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE RAIZ DE *Pouteria ramiflora* Radlk.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira.**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Dâmaris Silveira**

**BELÉM-PA
2004**

ORIENTADORA

Prof. Dra. VANIA MARIA MORAES FERREIRA - UFPa

CO-ORIENTADORA

Prof. Dra. DÂMARIS SILVEIRA - UnB

Os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos no Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, em um trabalho em parceria com o Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Enéas de Andrade Fontes Júnior

**INVESTIGAÇÃO DAS POSSÍVEIS ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE RAIZ DE *Pouteria ramiflora* Radlk.**

Dissertação aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará. A comissão examinadora foi formada pelos professores:

Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira (orientadora)
Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento
Departamento de Fisiologia

Prof. Dr. Cristóvam Wanderley Picanço Diniz
Departamento de Anatomia

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa
Departamento de Farmácia

Belém-PA, 29 de outubro de 2004

À minha amada esposa, Gizele Fontes, por
todo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A DEUS, o supremo orientador de minha vida;
- ✓ Ao Instituto Evandro Chagas, pelos fornecimentos dos animais experimentais utilizados nesta dissertação, que sem esses, com certeza, esse trabalho seria inviabilizado;
- ✓ Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília pelo fornecimento dos extratos de plantas;
- ✓ Ao Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, do Departamento de Farmácia de nossa Universidade, que me direcionou nessa linha de pesquisa e a quem devo o meu grande conhecimento científico;
- ✓ Aos Profs. José Luiz Martins do Nascimento, Vânia Ferreira e Dâmaris Silveira que me auxiliaram na conclusão dessa pesquisa;
- ✓ Aos meus familiares e amigos que entendem a minha ausência e muito me dão força nessa etapa de minha carreira científica.

“... Feliz o homem que acha sabedoria e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo que podes desejar não é comparável a ela...”

AT, PROVÉRBIOS 3, 13-15

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
1. PLANTAS MEDICINAIS	1
2. GÊNERO POUTERIA (Espécie <i>Pouteria ramiflora</i>)	4
3. FISIOPATOLOGIA DA DOR E INFLAMAÇÃO	6
a) Vias nociceptivas	7
Caracterização das fibras aferentes periféricas.....	7
Transmissão e processamento dos impulsos nocivos.....	10
Vias ascendentes e modulação da dor_.....	12
b) Inflamação e sua participação no processo da dor.....	15
4. MECANISMOS DE AÇÃO DE DROGAS ANALGÉSICAS E ANTIINFLAMATÓRIAS	17
II. OBJETIVOS	22
III. MATERIAL E MÉTODOS	23
1. ANIMAIS	23
2. DROGAS	23
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	24
a) Determinação da DL ₅₀	24
b) Avaliação da atividade antinociceptiva	24
Teste das contorções induzidas por ácido acético.....	24
Teste da placa aquecida.....	25
Teste da nocicepção induzida pela formalina.....	26

c) Avaliação da atividade antiinflamatória	27
Preparação da bolsa de ar e inflamação local	27
Cultura de células do exsudato inflamatório	28
Análises bioquímicas	29
☞ Medida da atividade da Adenosina Deaminase	29
☞ Ensaio de Nitrito	29
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
IV. RESULTADOS	31
1. TOXICIDADE AGUDA	31
2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.....	32
a) Estímulo nociceptivo induzido pelo ácido acético	32
b) Estímulo térmico nociceptivo	33
c) Estímulo nociceptivo induzido pela formalina	34
3. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	35
a) Ativação e migração celular	35
b) Atividade da Adenina Deaminase	37
c) Síntese de Óxido Nítrico	38
V. DISCUSSÃO	39
VI. CONCLUSÕES	47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – <i>Pouteria ramiflora</i>	4
Figura 2 – Fibras aferentes periféricas	8
Figura 3 – Vias de condução da dor e nocicepção.....	13
Figura 4 – Vias de modulação da dor.....	15
Figura 5 – Desenvolvimento do processo inflamatório	16
Figura 6 – Teste do ácido acético.....	25
Figura 7 – Teste da placa quente.....	26
Figura 8 – Teste da formalina.....	27
Figura 9 – Modelo de inflamação local	28
Figura 10 – Cultura de exsudato inflamatório	36
Gráfico 1 – <i>P. ramiflora</i> x contorções abdominais.....	32
Gráfico 2 – <i>P. ramiflora</i> x estímulos térmicos.....	33
Gráfico 3 – <i>P. ramiflora</i> x teste da formalina.....	34
Gráfico 4 – <i>P. ramiflora</i> x ativação e migração celular	35
Gráfico 5 – <i>P. ramiflora</i> x adenosina deaminase.....	37
Gráfico 6 – <i>P. ramiflora</i> x síntese de óxido nítrico	38

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT₁	Receptor de 5-hidroxitriptamina do subtipo 1
AA	Ácido aracdônico
AC	Adenilato ciclase
ADA	Adenosina deaminase
ATP	Adenosina trifosfato
BK₁ e BK₂	Receptores de bradicinina e calidina
CGRP	Peptídios relacionados ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
COX₁	Variedade constitutiva da COX
COX₂	Variedade induzível da COX
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Meio de cultura Dulbecco (<i>do inglês Dubelco Modified Eagle Medium</i>)
EAA	Aminoácidos excitatórios
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EERPr	Extrato etanólico de raiz de <i>Pouteria ramiflora</i>
eNOS	Isoforma endotelial da NOS
FAP	Fibra aferente periférica
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
HA	Histamina
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Isoforma induzível da NOS
NGF	Fator de crescimento de neurônios
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
PLC	Fosfolipase C
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P

v.o. Via oral

RESUMO

O uso de plantas na medicina popular, visando o tratamento de algumas patologias, sejam centrais ou periféricas, pode ter alguma base científica. O objetivo do presente estudo foi investigar as atividades antinociceptivas e antiinflamatórias do extrato etanólico da raiz de *Pouteria ramiflora* (EEPr). Para esta pesquisa foram usados camundongos Suíços machos, com 3 meses de idade. A toxicidade do extrato foi testada. Doses nas faixas de 100, 500 ou 1.000 mg/kg, administradas por gavagem, foram usadas para avaliar-se a toxicidade aguda. Nesta investigação, os camundongos foram observados quanto a qualquer mudança comportamental por um período de 4h a partir da administração do EEPr. Essas observações também foram realizadas com 12 e 24h. Os animais toleraram a dose de 100 mg/kg, sem ocorrer nenhuma espécie de toxicidade ou mortalidade. As mortes ocorreram somente com as doses de 500 ou 1000 mg/kg. Três modelos experimentais de nocicepção foram usados para examinar o efeito analgésico do EEPr, envolvendo tanto estímulos nociceptivos químicos (ácido acético e formalina), quanto térmico (placa aquecida). Os extratos das plantas e os solventes foram todos dados por gavagem, 1h antes dos estímulos químicos ou térmicos. Os controles positivos, morfina ou indometacina, foram usados para comparar as respostas farmacológicas dos EEPr. A atividade antiinflamatória foi estudada em ratos Wistar (n=4), através do modelo da bolsa de ar, com inflamação induzida por carragenina (1 mg/kg). A partir do exsudato inflamatório foram feitas culturas de células para examinar as concentrações de óxido nítrico e a atividade da adenosina deaminase. Os resultados mostraram uma inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, aumentado tempo de reação no teste da placa quente e uma inibição da primeira (0-5 min) e segunda fases (15-30 min) no teste da formalina. O EEPr foi capaz de inibir a migração celular, a síntese de óxido nítrico e a atividade da adenosina deaminase, com efeitos mais potentes que a indometacina. Tomados em conjunto, os resultados sugerem uma potente atividade antinociceptiva e antiinflamatória dos EEPr em doses que não apresentaram toxicidade aguda. Os exatos mecanismos de ação que estão envolvidos com essas respostas ainda não foram identificados até o presente momento. Estudos complementares devem ser realizados na tentativa de se conhecer, não somente os exatos mecanismos analgésicos e antiinflamatórios apresentados pelos EEPr, mas também quais os seus constituintes que estão diretamente relacionados com aquelas atividades.

ABSTRACT

The use of the plant in the folk medicine for some central or peripheral pathology treatments may have some scientific basis. The aim of the present study was to investigate the antinociceptive and antiinflammatory activities of *Pouteria ramiflora* root ethanolic extract (EEPr). For this research it was used male Swiss mice, 3 months old. The toxicity of the EEPr was tested. Doses ranging from 100, 500 or 1000 mg/kg, by gavage, were used to assess the acute toxicity. In this evaluation, mice were closely observed for any change in behavior during 4h of the EEPr administration, and also inspected 12 and 24 h thereafter. The animals tolerated 100 mg/kg, without significant signs of toxicity or overt mortality. Deaths were only observed with 500 or 1000 mg/kg.

Three experimental models of nociception were used to examine the analgesic effect of the EEPr, involving both chemical nociceptive stimuli (acetic acid and formalin) and thermal stimulus (hot plate). The EEPr or solvents were given by gavage 1 hour prior to the chemical or thermal stimulus. Positive controls, using morphine (10 mg/kg) or indomethacine (10 mg/kg), were used to compare the EEPr pharmacological responses. The antiinflammatory activity was studied in Wistar rats (n=4), through the air pouch model, with inflammation induced by carragenin (1 mg/kg). Cell cultures to examine nitric oxide concentration and adenosine deaminase activity were also investigated. The results showed an inhibition of acetic acid-induced abdominal constriction, increased reaction time in the hot-plate test and an inhibition of the first (0-5 min) and second phase (15-30 min) of formalin induced hindpaw licking. The extract was able to inhibit the cell migration, the nitric oxide synthesis and the adenosine deaminase activity, with more potent effects than the indomethacine. Taken together, the results suggest a potent antinociceptive and antiinflammatory activities of the EEPr in the doses that had not disclosed to possess acute toxicity. The precise mechanism underlying all these response has not been identified yet. Further studies must be conducted in order to clarify the exact antinociceptive and antiinflammatory mechanisms of the EEPr and to figure out which constituent of the extract exerts these activities.

I. INTRODUÇÃO

1. PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais, segundo relatam os testemunhos históricos pertencentes a diferentes civilizações e culturas, é quase tão antiga quanto a própria humanidade (Corrêa Júnior e cols., 1991). Até cerca de 2.000 anos a.C., as plantas desempenhavam dois papéis fundamentais nas comunidades primitivas: o de complementos alimentares essenciais; e o místico/religioso/curativo, que ainda pode ser visto em algumas comunidades indígenas preservadas. Um conhecimento acumulado empiricamente através de várias gerações e entre diversas etnias, hoje, é trazido para laboratórios que buscam evidências de sua aplicabilidade em terapêuticas (Di Stasi, 1996). Tornase claro este interesse ao observarmos que grande parte dos recursos medicamentosos, utilizados em toda a história, provém do reino vegetal (Graça, 1990).

No Brasil, a inexistência de literatura tradicional alicerçou a medicina popular em informações verbais transmitidas pelos índios, europeus e negros, principais formadores da etnia brasileira, e na influência de outras populações imigrantes (Borrás, 2003). Entre as muitas plantas utilizadas popularmente, que tiveram suas origens junto aos povos indígenas, habitantes de nosso país, e que delas faziam uso, destacam-se a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha*), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e o guaraná (*Paullinia cupana*). As plantas de origem européia, trazidas pelos colonizadores, também tiveram rápida difusão entre o povo brasileiro, como foi o caso da camomila (*Matricaria chamomilla* L.), da melissa (*Melissa officinalis* L.) e a malva (*Malva sylvestris* L.). A utilização de

outras plantas nativas das Américas difundiu-se devido à grande importância terapêutica a elas atribuída pela população, como é o caso do boldo (*Peumus boldus* Mol.), a macela (*Acchyroclines saturoioides* D.C.), o quebra-pedra (*Phyllanthus nirurii* L. e *P. urinaria* L) (Revilla, 2001; Borrás, 2003).

O Brasil, possuidor de uma flora rica, composta de uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas, constitui-se o país mais rico do mundo em espécies vegetais, e que muito pode contribuir para o avanço da medicina mundial. De toda a cobertura vegetal existente no planeta, cerca de 2/3 das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais, de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul. Somente o Brasil detém aproximadamente 60.000 espécies representando um total de 20% de todas as espécies da flora mundial, e supõe-se que existam mais de 10.000 espécies ainda não catalogadas na Floresta Amazônica (Albagli, 2001).

Até o aperfeiçoamento da síntese química, as plantas eram o principal recurso no tratamento das doenças das mais diversas origens. Os conhecimentos acumulados pela medicina popular, por exemplo, permitiram o desenvolvimento de medicamentos utilizados na clínica médica, como os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, entre outros. Com o avanço e a eficácia das novas drogas sintéticas, principalmente a partir da Segunda Grande Guerra, quando a indústria química descobriu e aperfeiçoou processos de produção sintética dos diversos princípios ativos, anteriormente obtidos somente nas plantas, o consumo dos produtos naturais começou a ser mais reduzido (Berg, 1993; Ming, 1994). Com passar dos anos, e o aparecimento de sérias reações adversas a produtos sintéticos, a população começou a

redescobrir as plantas medicinais e procurar nelas a solução para esses problemas. Por serem produtos que se encontram disponíveis em qualquer centro comercial popular e em algumas farmácias, ou seja, de fácil acesso e custo acessível, intensificou-se o consumo (Berg, 1993).

Segundo uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial recorre à medicina tradicional para satisfazer suas necessidades de cuidados primários de saúde. Os fitoterápicos de utilização popular, mais freqüentemente utilizados, são derivados de 25.000 espécies de plantas, sendo que foram catalogadas mais de 365.000 delas. Desse total, somente cerca de 1.100 espécies já foram estudadas como fonte de compostos biologicamente ativos, e em sua grande maioria, espécies européias. Muito há, ainda, para se conhecer da flora mundial. E esse conhecimento precisa ser coordenado e assentado sobre bases científicas seguras. Apesar do progresso feito pela química orgânica sintética e a biotecnologia, as plantas são ainda uma fonte de obtenção indispensável de conhecimento de drogas e de material fresco para muitas preparações (Corrêa Júnior e cols., 1991). A nossa responsabilidade, como potenciais fornecedores de matéria-prima para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos, é enorme e passa, necessariamente, por uma mudança radical nas diretrizes da exploração racional, e no estudo científico das espécies com potenciais terapêuticos para a utilização clínica.

2. GÊNERO *POUTERIA*

Espécies da família Sapotaceae, ocorrentes no Bioma Cerrado dos arredores de Brasília, são árvores grandes e bastante arborizadas. Elas crescem bem em solos pesados, começam a florar com 7 a 8 anos e são normalmente propagadas por sementes, que podem germinar mais facilmente se a casca dura for removida antes da plantação. No que se refere mais especificamente à *Pouteria ramiflora* Radlk (figura 1), popularmente conhecida como guapeva, curriola (“curiola”), é uma árvore de até 6 m de altura, tronco com casca de coloração acinzentada, folhas duras, verdes na face superior e ligeiramente ferrugínea na inferior, flores pequenas e frutos que apresentam forma ovóide, de coloração alaranjada, com polpa esbranquiçada, contendo uma única semente de cor roxa, que surgem no período de dezembro a janeiro. Curriola é, ao mesmo tempo, designação para frutas e árvore bem conhecidas e freqüentes em quase todo o território nacional (Pennington, 1990; Lorenzi, 1992).

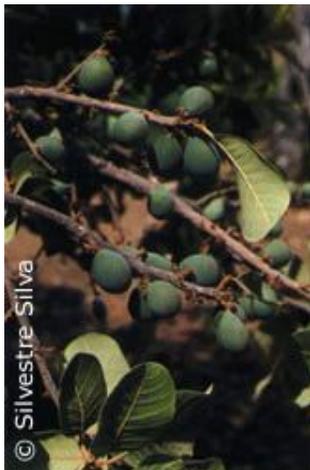


Figura 1 – Espécie *Pouteria ramiflora*

Originárias do Brasil, árvores com esse nome, podem ser encontradas desde a Amazônia até a Bahia, seguindo por Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo, até chegar ao Paraná. Algumas espécies preferem o ambiente da floresta pluvial, nas regiões amazônicas (*Pouteria torta*); outras preferem o cerrado (*Pouteria ramiflora*). Geralmente, os frutos da curiola são esverdeados ou alaranjados e, algumas vezes, possuem uma coloração esbranquiçada, fato bastante raro na natureza. Sua polpa, também branca, é comestível e muito saborosa. Habitualmente, a curiola é apenas consumida *in natura*. No entanto, técnicos do Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado da EMBRAPA de Brasília vêm testando e aprovando receitas de geléias e de batidas feitas com a polpa da fruta.

Além das áreas onde sua ocorrência é espontânea, a curiola pode ser encontrada em plantação, nos pomares domésticos daqueles que sabem apreciar o sabor de seus frutos e a sua beleza. A árvore, de características ornamentais próprias, não é muito alta e apresenta uma bonita copa de conformação uniforme, o que a torna indicada na arborização de ruas, parques e jardins (<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/curiola.html>). Há relatos, a partir da Etnomedicina, que diversas espécies dessa família são usadas com supostas ações antimicrobianas e antiinflamatórias (Berg, 1993). Cabe, entretanto, investigar cientificamente as possíveis propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias das espécies de *Pouteria*, em especial da *Pouteria ramiflora*.

3. FISIOPATOLOGIA DA DOR E INFLAMAÇÃO

Na busca pelo alívio do sofrimento humano, ao longo dos séculos, vem-se esbarrando em uma sensação complexa que une componentes psicológicos e físicos, sendo geralmente imprevisível, visto que em certos momentos é totalmente rebelde aos tratamentos mais drásticos e em outros é aliviada simplesmente com a sugestão. A este fenômeno tão complexo, temos denominado dor (Loeser, 1994; Loeser e Melzack, 1999).

Apesar de possuir uma denominação tão simples, sua conceituação tem desafiado o homem há séculos. Aristóteles a reconhecia como “um estado de alma, uma experiência oposta ao prazer”. Desde sua época, diversos outros conceitos surgiram na tentativa de abranger todas as suas características, sendo então postulado pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain) que a dor seria “uma sensação desagradável e experiência emocional associada a um dano tecidual real ou potencial dano de tecidos, ou descrita em termos de danos semelhantes” (Oliveira, 1979; Loser e Melzack, 1999).

Existem, no entanto, diversas modalidades de dor, primariamente definidas como: 1) *dor passageira*, que se relaciona à ativação de receptores de dor, que, na eminência de um dano tecidual, se direciona à prevenção deste dano em eventos incidentais. É também identificada na dor de procedimentos – comumente vista no dia-a-dia e não requer tratamentos especiais; 2) *dor aguda*, proveniente de danos físicos estabelecidos que alteram as respostas centrais,

gerando uma sensação localizada de curta duração (de horas a semanas) e intensidade variável; e 3) *dor crônica*, que não está obrigatoriamente relacionada a danos teciduais, estando mais relacionada a alterações de componentes neurais da condução da dor, gerando um evento persistente (de meses a anos) com intensidade também variável (Loser 1994; Loser e Melzack, 1999; Millan, 1999). A dor crônica pode ainda ser dividida em quatro subtipos: dor do câncer, dor por injúria de nervos, dor por doenças crônicas e a dor idiopática (Loser, 1994).

Atualmente, têm-se distinguido eventos dolorosos em quatro níveis: A *nocicepção* – a detecção de dano tecidual por ativação das vias nociceptivas; a *percepção de dor* – gerada por estímulos nocivos, e pouco se relaciona em intensidade com a abrangência do dano ou intensidade da doença; o *sofrimento* – resposta psicológica negativa; e a *dor comportamental* – reação comportamental, por vezes não associada à injúria (Loser e Melzack, 1999).

a) Vias da nocicepção:

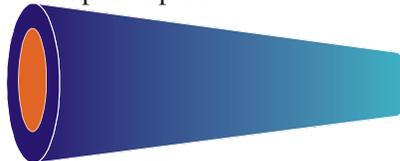
Caracterização das fibras aferentes primárias (FAPs):

A nocicepção inicia-se com a ativação das FAPs, que podem ser classificadas em três grupos, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução (figura 2): 1) As *fibras C*, que possuem entre 0.4–1.2 μm de diâmetro, não mielinizadas, com baixa velocidade de condução (0.5–2.0 m/s); 2) *fibras A δ* , com 2–6 μm de diâmetro, mielinizadas e de velocidade intermediária (12–30 m/s); 3) e as *fibras A β* , com diâmetro superior a 10 μm , mielinizadas e de extrema velocidade de condução (30–100 m/s). Na pele, estão distribuídas em

proporções de 70, 10 e 20%, respectivamente (Cervero, 1994; Julius e Basbaum, 2001). Dentre esses três grupos de FAPs é reconhecido que, no tecido cutâneo, somente as fibras C e A δ são capazes de conduzir estímulos nocivos em condições normais, sendo que as A β estão relacionadas unicamente com estados patológicos específicos como a alodinia mecânica, que corresponde a uma sensação dolorosa sob estímulos mecânicos não nocivos (Millan, 1999; Julius e

Fibras A α e β

- # Mielinizada;
- # Largo calibre
- # Proprioceptora



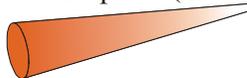
Fibras A δ

- # Levemente mielinizadas;
- # Diâmetro médio;
- # Nociceptora (Química, Mecânica e térmica)



Fibras C

- # Amielinizadas;
- # estreito calibre;
- # Nociceptora (mecânico, térmico e químico)



Basbaum, 2001).

I. Figura 2 – Fibras aferentes periféricas

Existem diversas classes de fibras C e A δ , no entanto, sua classificação se torna muito difícil em virtude de diversos fatores como a similaridade de propriedades e os complexos métodos de identificação (Willis e Coggeshall, 1991). As fibras C apresentam nociceptores quimioespecíficos (ativados por

mediadores químicos como bradicinina, prostaglandinas (PGs), entre outros), termoespecíficos (ativados por aquecimento ou resfriamento) e mecanorreceptores de baixo limiar, ativados por pressão, podendo ser diferenciada uma grande quantidade de fibras C que expressam nociceptores de alto limiar para estímulos mecânicos e térmicos. No entanto, a denominação 'polimodais' (PMN – *polymodal nociceptors*), conferida às fibras C, se destina a variedade que responde também a estímulos químicos irritantes (Handwerker e Kobal, 1993; Simone e Kajander, 1997).

Os PMN estão diretamente relacionados à geração da facilitação medular inerente aos estados dolorosos crônicos. Alguns estudos demonstraram a existência de fibras C com nociceptores que respondem exclusivamente a estímulos nocivos caloríficos (acoplados a canais de Ca^{2+}) relacionados à resposta axonal explosiva, na inflamação de origem neurogênica. Outra variedade, sensível à ativação por histamina está associada ao prurido (Millan, 1999).

As fibras $A\delta$ se subdividem em fibras 'grupo I', de alto limiar, ativadas por estímulos mecânicos em níveis nocivos, com baixa sensibilidade a estímulos térmicos – quentes ou frios. No entanto, após estímulos térmicos repetitivos, sofre uma sensibilização a estímulos adicionais. O 'grupo II' apresenta um menor limiar para estímulos térmicos (Handwerker e Kobal, 1993; Simone e Kajander, 1997). Na ausência de lesões teciduais ou neuronais as fibras $A\beta$ respondem unicamente a estímulos não nocivos como toque, pressão e outros (Willis e Coggeshall, 1991; Woolf e cols., 1994; Woolf e Doubell, 1994).

Alguns estudos indicam que as FAPs podem codificar as informações de intensidade e localização espacial do estímulo doloroso (térmico ou mecânico). No entanto, foi observado que o limiar de condução não corresponde exatamente à sensação *in vivo*, o que indica a existência de mecanismos centrais modulando o sinal de dor (Vierck e cols., 1997). A função de sinalização 'imediate' do estímulo agudo corresponde ao estado de alerta da dor que funciona com pequenas intervenções dos mecanismos centrais e periféricos de modulação da dor. Entretanto, sob condição de lesão tecidual, observou-se uma facilitação central e periférica que intensifica e prolonga a dor (Handwerker e Kobal, 1993; Millan, 1999).

Outros órgãos, que não a pele, apresentam uma resposta diferenciada a estímulos nocivos, tendo como principais FAPs as fibras classificadas como grupo III mielinizadas, e grupo IV amielinizadas. As fibras do grupo III são associadas à musculatura esquelética, sendo sensíveis ao estresse mecânico, isquemia/hipóxia e aumento nocivo de pressão localizada, sendo caracterizadas como polimodais em analogia com as fibras C, anteriormente mencionadas. As fibras do grupo IV, geralmente mimetizam o grupo III em sua característica polimodal. Em conjunto, fornecem o 'alerta' para atividade muscular excessiva (Cervero e Laird, 1999).

Transmissão e processamento dos impulsos nocivos no corno dorsal da medula espinhal:

Os vários subtipos de FAP partem da periferia em direção às lâminas do corno dorsal da medula espinhal, onde fazem sinapse com os nervos medulares. As interações realizadas entre as FAPs e os nervos do corno dorsal são efetivadas através de transmissores químicos; assim sendo, pode-se ainda categorizar as FAPs levando em conta a sua natureza neuroquímica, visto que é grande a variedade de substâncias por elas

produzidas e liberadas. Entre as substâncias que se encontram envolvidas na neurotransmissão e neuromodulação estão o glutamato (GLU) e outros aminoácidos excitatórios (EAA), neuropeptídeos como a substância P (SP), os peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (CGRP), adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), PG e neurotrofinas que, associados a uma série de interleucinas, enzimas e outros neuropeptídios, comandam os processos de neurotransmissão e neuromodulação nas FAPs (Cao *e cols.*, 1998; Julius e Basbaum, 2001; Fisher *e cols.*, 2002).

Apesar da existência dos diversos transmissores, é bastante difícil diferenciar as classes de FAPs, de acordo com sua constituição bioquímica, em virtudes das muitas variantes envolvidas. Grande parte das fibras C é sensível à capsaicina, sendo distinguidas duas principais subpopulações: 1) as que liberam CGRP e/ou SP sob a influência de neurotrofinas e 2) as que possuem receptores para ATP em suas terminações periféricas, e são dependentes de fatores de crescimento neurais, sendo ainda definidas pela presença de interleucina IB-4 (Millan, 1999).

Quando se fala de transmissão, tem-se que levar em consideração não somente a substância a ser liberada pela FAP, mas também os efeitos sobre as fibras do corno dorsal. As características neuroquímicas das FAPs variam de acordo com o tecido que inervam, o tipo de lesão periférica gerado e a natureza bioquímica da substância por ela liberada (peptidérgicas e não-peptidérgicas). Os EAA, taucicinas e CGRP estão correlacionados às fibras finas, sensíveis a capsaicina, que partem da pele e outros tecidos. A mais conhecida taucicina, SP, juntamente com a neurocinina A, atuam por ativar os receptores NK_1 e NK_2 , que são receptores associados à fosfolipase C. O CGRP ativa os receptores $CGRP_1$ e $CGRP_2$, ambos acoplados a adenilato ciclase (AC) (Bowsher, 1987; Besson, 1999).

Vias ascendentes e modulação da dor:

A sensação dolorosa se inicia pela estimulação de nociceptores – receptores presentes nas FAP, ativados por estímulos nocivos. Essas fibras, de alto limiar excitatório, apresentam sua atividade alterada durante eventos nocivos e encaminham a informação nociva para a medula espinhal. A partir da ativação dos neurônios medulares, os estímulos são encaminhados para as vias ascendentes, incluindo os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e neoespinotalâmico, contando ainda com a via ascendente polissináptica que conduz os estímulos às regiões encefálicas do SNC,

conforme demonstrado na figura 3 (Willis, 1985; Besson e Chaouch, 1987; Keay *e cols.*, 1997; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001; Schim e Stang, 2004). Cada um dos caminhos corresponde à ativação de um núcleo talâmico e correspondente área cortical. O trato espinotalâmico ativa o núcleo lateral do tálamo, passando pela região cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo reticular paragigantocelular, onde se processa a ativação das vias descendentes inibitórias, que são fundamentais para o controle da dor. As demais vias se encaminham para os núcleos mediais (Man e Baragar, 1973; Mayer *e cols.*, 1976).

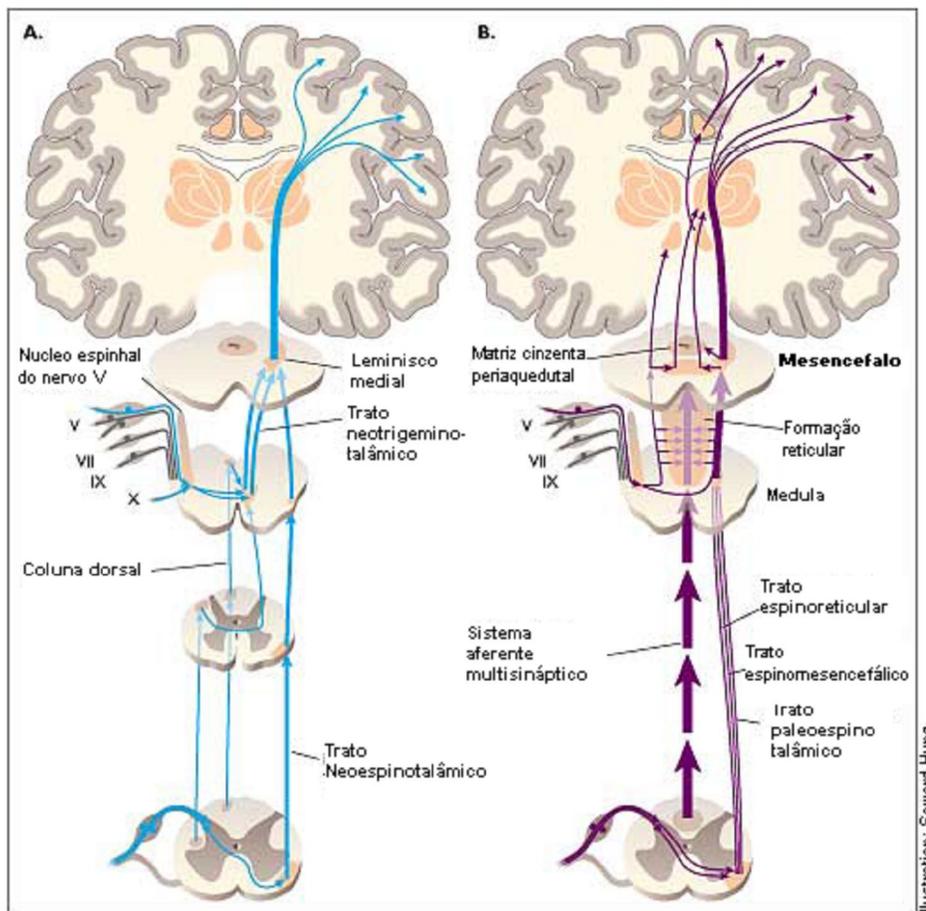


Figura 3 – Vias de condução da dor e nociceção – Uma vez que os estímulos nocivos chegam à medula são encaminhados às vias ascendentes, incluindo os tratos neoespinotalâmico, espino-reticular, espino-mesencefálico e paleoespino-talâmico, contando ainda com a via ascendente polissináptica que conduzirão os estímulos às regiões encefálicas do SNC, incluindo a formação reticular, substância cinzenta periaquedutal, ativando os núcleos talâmicos que encaminha os estímulos para as diversas regiões do córtex cerebral (modificado de Seward Hung Illustrations)

A partir do tálamo, os impulsos seguem pelos feixes talamo-corticais, sendo direcionados para as diversas áreas do córtex cerebral. No encéfalo, são estabelecidas as principais

características da dor como a localização têmporo-espacial (neocórtex) e integração afetivo-motivacional (sistema límbico e hipotálamo) (Man e Baragar, 1973; Mayer *e cols.*, 1976).

Uma vez ativadas, as vias ascendentes espinotalâmica e espino-reticular, promovem o acionamento de fibras descendentes, em nível reticular, talâmico e da periaquedutal, que envolvem fibras serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas (Holstege *e cols.*, 1996; Millan 1995, 1998; Zhang *e cols.*, 1997; Bardin e Colpaert, 2004), sendo mais recentemente evidenciada a participação de fibras GABAérgicas, colinérgicas e encefalinérgicas, integrando as vias descendentes de modulação da dor.

A inibição da transmissão do estímulo doloroso no corno dorsal da medula, se trata simplesmente da ação de interneurônios inibitórios sobre os terminais medulares das FAPs (figura 4) (Arvidson *e cols.*, 1995; Antal *e cols.*, 1996; Peng *e cols.*, 1996; Millan 1998; Jia *e cols.*, 2004). No que se refere ao componente colinérgico, este age pela ativação de receptores muscarínicos localizados nos terminais das FAPs (Coggeshall e Carlton, 1997; Höglund e Baghdoyan, 1997; Dussor *e cols.*, 2004).

As vias opióides se relacionam à liberação de encefalina e dinorfina, componentes importantíssimos no ponto de vista do tratamento da dor, agindo sobre receptores opióides do tipo μ (mu), κ (kappa) e/ou δ (delta), que são receptores acoplados a proteína G inibitória (G_i), promovendo a inibição da adenilato ciclase, nos terminais das FAPs (Millan, 1986; Coggeshall e Carlton, 1997; Ossipov *e cols.*, 1997).

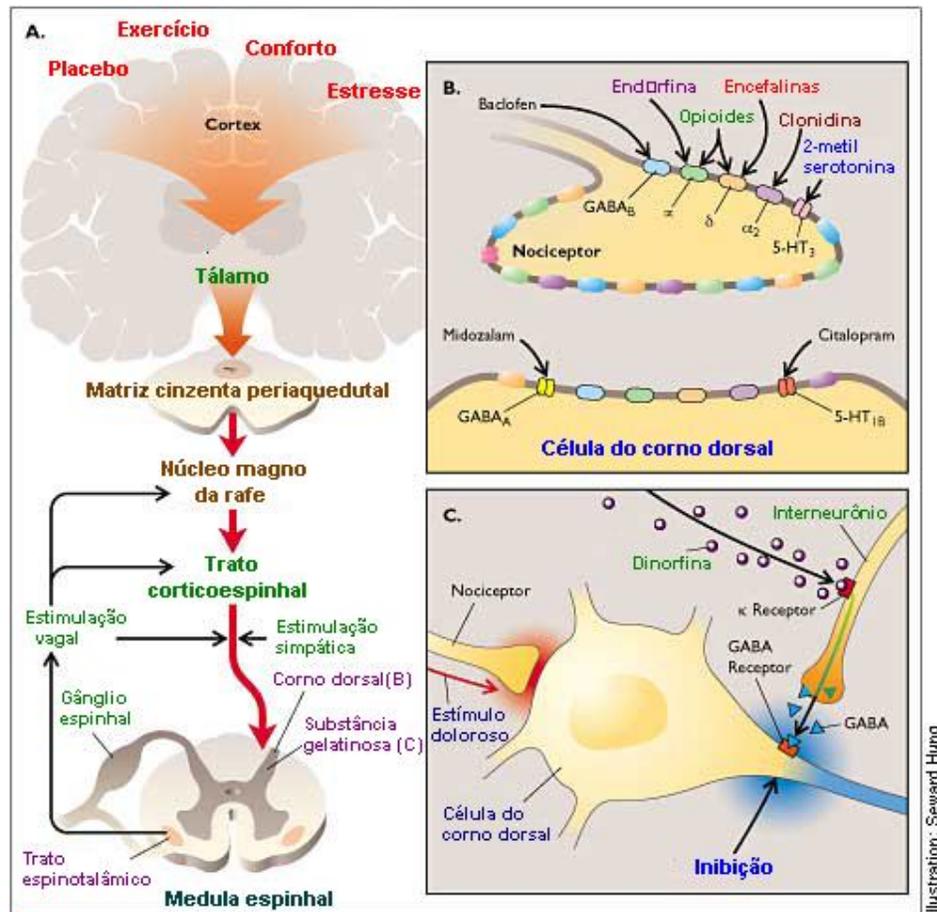


Figura 4 – Vias de modulação da dor – A modulação da dor pode ser originada (A) de níveis centrais, sendo ativada a partir de estímulos corticais, talâmicos e da matriz cinzenta, e/ou periféricos, com influência do Sistema Nervoso Autônomo e estímulos mecânicos, (B e C) que convergem para o sistema de controle da dor no corno dorsal da medula, envolvendo diversos mediadores químicos e podendo ser influenciados por xenobióticos (modificado de Seward Hung Illustration)

b) In agente lesivo, no entanto em alguns momentos pode gerar transtornos ao organismo. Durante um dano tecidual ocorre a ativação de uma cascata de eventos que promovem a formação e liberação de mediadores da inflamação, alguns dos quais, por serem vasoativos, geram extravasamento plasmático e migração de células de defesa (mastócitos, monócitos, linfócitos e neutrófilos principalmente), podendo desencadear uma resposta imune celular, com participação significativa de linfócitos T_H que induzem, via liberação de interleucinas (IL2), a proliferação de Linfócitos T_C e também a diferenciação de

Linfócitos B em plasmócitos desencadeando uma resposta humoral (Male, 1999; Colville e Gilroy, 2000; Abbas e *cols*, 2003). A presença de granulócitos liberando autacoides no tecido lesionado potencializa o processo inflamatório, sendo formado um exsudato no local (Robbins, 2000).

Os mediadores inflamatórios podem ainda ativar e/ou sensibilizar as FAPs, caracterizando uma hiperalgesia primária, que é explicada basicamente pelos processos periféricos (figura 5). A hiperalgesia primária, como mencionado, está sempre acompanhada de um dano tecidual, com a promoção de função anormal dos termocetores e mecanocetores – redução de seu limiar de ação (Reeh e *cols.*, 1986, 1987; Dray e Urban, 1996;). Entre os mediadores incluímos a serotonina, bradicinina e PGs, e mais recentemente estudados, citocinas, prótons

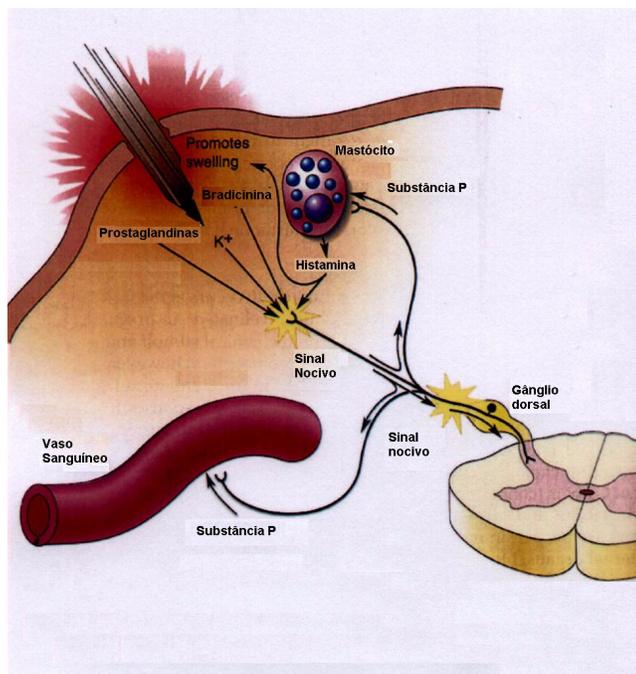


Fig. 5 – Desenvolvimento do processo inflamatório: a partir de um dano tecidual de origem química, mecânica, térmica e/ou microbiológica é desencadeado o processo inflamatório com a participação de mediadores químicos e células inflamatórias que, em interação com as fibras aferentes periféricas, estabelecem o estado de hiperalgesia primária (modificado de Bear e *cols.*, 2001).

e neurotrofinas, sendo possível distinguir os diversos mecanismos pelos quais afetam as FAPs, promovendo excitação sensibilização e/ou modulação (Moncada e *cols.*, 1978; Cohen e Perl, 1988; Reeh e Kress, 1995; Dray e Urban, 1996).

4. MECANISMO DE AÇÃO DE DROGAS ANALGÉSICAS E ANTIINFLAMATÓRIAS.

Lesões teciduais e/ou inflamação levam à ativação de calicreínas no plasma e nos tecidos (Marceau, 1995), que geram cininas (bradicinina, como a mais importante) e calidinas, a partir de polipeptídeos precursores. Estas são rapidamente metabolizadas formando des-arg⁹-bradicinina e des-arg¹⁰-calidina que estão diretamente envolvidos com a modulação e ativação de nociceptores (Marceau, 1995). Estas substâncias agem sobre receptores tipo BK₁ e BK₂, que são acoplados a proteína G (Marceau, 1995; Hall, 1997). Os receptores BK₂ promovem a despolarização das FAPs por aumentar a condutância ao Na⁺ (Dray e Urban, 1996), via ativação da fosfolipase C (PLC), resultando na ativação de canais de Na⁺ (McGuirk e Dolphin, 1992; Cesare e McNaughton, 1996). A bradicinina atua como ativador e sensibilizador de nociceptores. A ativação leva a uma dor imediata, e à sensibilização a hiperalgesia inflamatória (Ferreira e cols., 1993).

As PGs são derivadas do ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), que por sua vez é sintetizado por metabolização de fosfolipídios, via fosfolipase A₂. A síntese de PGs dependem basicamente de duas reações; 1) uma reação via ciclooxigenase para a formação de prostaglandina G₂ (PGG₂) precursora e 2) uma reação de peroxidação que leva a formação de prostaglandina H₂ (PGH₂), a partir da qual se formam as outras.

Dentre as PGs, atualmente conhecidas, as que apresentam maior importância no relevante a hiperalgesia são as PGE₂ e PGI₂ (prostacilinas). Estas agem sobre as FAPs nociceptoras, promovendo uma sensibilização das fibras e

também uma ativação da via, por ativação dos receptores de PGE₂ e de PGI₂, respectivamente (Levine e cols., 1986; Samuelsson e cols.,1987; Rang e cols., 1991; Bakhle e Botting, 1996; Boie e cols., 1997). A metabolização do ácido araquidônico pela via das lipoxigenases origina os leucotrienos - mediadores da liberação de dihidroxieicosatetraenóico além de indutor da síntese e liberação de eicosanóides em macrófagos e basófilos (Levine e cols., 1986; Samuelsson e cols.,1987; Rang e cols., 1991).

A enzima responsável pela produção das PGs é conhecida como ciclooxigenase (COX) ou, por alguns autores, “endoperóxido-redutase”. A COX apresenta-se amplamente distribuída em todos os tecidos, em diversas isoformas, as quais podem ser agrupadas em dois grupos distintos: 1) as constitutivas (COX₁), que produzem as quantidades requeridas pelo organismo para a regulação de funções vitais e sinalização celular; e 2) as induzidas (COX₂), que podem gerar grandes quantidades de PGs, estando, geralmente, sua ativação, associada a eventos patológicos. Há uma isoforma constitutivas, presente em neurônios, porem com estrutura semelhante a COX₂, podendo ser regulada por eventos neuronais (Breder e cols., 1995; Beiche e cols., 1996; Willingale e cols., 1997). A COX₂ seria a enzima mais importante para a síntese de PGs em estados inflamatórios, levando em consideração, inclusive, o aumento de sua expressão gênica nesses estados(Hay e Bellerocche, 1997).

Entre os fatores que atuam na indução da COX₂, tem sido demonstrada a grande importância do NO e citocinas, principalmente as interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), apesar de se observar uma atividade

inibitória das IL-4 e IL-10 (Bakhle e Botting, 1996; Perkins e Dray, 1996; Wagner e cols., 1998).

O ATP é capaz de induzir dor, via ativação direta de fibras finas (Rang e cols., 1991; Burnstock e Wood, 1996; Bland-Ward e Humphrey, 1997). Tal efeito é mediado por um aumento do influxo de Ca^{2+} , pela ativação de receptores tipo P_{2x} , que são receptores ionotrópicos, ou pela ativação de receptores metabotrópicos tipo P_{2y} – acoplados positivamente a PLC (Bouvier e cols., 1991; Burnstock e Wood, 1996; Collo e cols., 1996; Robertson e cols., 1996; Thorne e Housley, 1996; Khakh e cols., 1997; Sawynok e Reid, 1997; Svichar e cols., 1997).

A serotonina (5-HT, 5 Hidroxitriptamina) é liberada por plaquetas, mastócitos e/ou células endoteliais, atuando através da ativação de receptores 5-HT₃ – receptor acoplado a PLC, com produção de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃); podendo ativar, também, canais de Na⁺; e assim, ativar as FAPs nociceptoras, tanto C quanto A δ (Grubb e cols., 1988; Guilbaud e cols., 1989; Millan, 1995; Abbott e cols., 1996; Ronde e Nichols, 1997; Pierce e cols., 1997).

A histamina (HA), ainda que sendo um conhecido fator inflamatório, pouco se relaciona com processos dolorosos, exceto em grandes concentrações, onde atua como ativador e sensibilizador de nociceptores, levando a uma dor imediata, e à sensibilização à hiperalgesia inflamatória (Ferreira e cols., 1993), porém estando, geralmente, mais correlacionada com sensações de prurido (LaMotte e cols., 1987; Rang e cols., 1991). A ação excitatória da HA é mediada principalmente por receptores H₁, promovendo uma liberação de SP e CGRP nos terminais das FAPs (Tani e cols., 1990; Bileviciute e cols., 1997; Hill e cols., 1997).

O NO é também uma das substâncias que reflete grande importância nos mecanismos da dor e da inflamação. Originalmente denominado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), o NO é um gás solúvel que participa dos processos fisiológicos de vasodilatação, agregação plaquetária, defesa antibacteriana e neurotransmissão, além de participar do processo inflamatório (Furchgott, 1993; Robbins e Grisham, 1997). O NO é sintetizado a partir da L-arginina por atuação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS), em células endoteliais, neurônios e também em células de defesa como macrófagos (Bredt e Snyder, 1994; Goodwin e cols., 1999).

Atualmente se distinguem três variedades de NOS: NOS I, presente em células neuronais, por isso sendo também conhecida como nNOS; NOS II, presentes em células de defesa, incluindo polimorfos nucleares e macrófagos; e NOS III, ou NOS endotelial (eNOS). A produção de NO está intimamente associada à ativação da atividade fagocítica de macrófagos e a migração celular durante o processo inflamatório, além de agir como indutor da COX₂ (Bakhle e Botting, 1996; Perkins e Dray, 1996; Levy e Zochodne, 2004).

A adenosina desaminase (ADA), é uma enzima relacionada com o metabolismo de purinas, mediando a desaminação da adenosina, participa do processo de proliferação de linfócitos mediante processo inflamatório e/ou estímulo mitótico. A inibição da ADA pode promover um decréscimo no número de linfócitos B e T, servindo como um marcador para estes processos (Hovi e cols., 1976; Rodrigues e cols., 1994; Resta e Thompson 1997; Conlon e Law, 2004).

Nossa proposta de estudo, portanto, foi investigar, através de modelos clássicos de analgesia e inflamação dentro da Farmacologia Celular, até que ponto a espécie *Pouteria ramiflora* podia ou não apresentar as atividades analgésicas e/ou antiinflamatórias sugeridas pelo uso popular como uma forma de contribuir para as inúmeras lacunas que encontram-se em aberto quanto a esses estudos que aqui foram abordados.

II. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar as possíveis atividades analgésicas e antiinflamatórias do extrato etanólico de raiz de *Pouteria ramiflora* (EEPr).

Específicos:

Para investigar as alterações comportamentais, que poderiam auxiliar nas análises das respostas analgésicas, os seguintes objetivos foram levados em consideração:

- Observar possíveis atividades do EEPr na resposta a estímulos químicos viscerais nocivos no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- Verificar a capacidade do EEPr, levando-se em consideração o limiar nociceptivo, em alterar a latência de camundongos em uma superfície de cobre aquecida a 55°C;
- Investigar se as dores de origem neuropática e inflamatória, através do teste da formalina, poderiam ser bloqueadas pelo pré-tratamento com EEPr.

Objetivando investigar as respostas antiinflamatórias do extrato, procurou-se observar possíveis alterações celulares, através dos objetivos:

- Observar a eficácia do EEPr nos processos inflamatórios localizados, fazendo-se uso do modelo de inflamação da bolsa de ar, tendo como agente indutor flogístico a carragenina.
- Investigar, através do exsudatos inflamatórios, a ação dos EEPr sobre a migração celular, a concentração de NO e atividade da enzima ADA.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Neste trabalho, foram utilizados camundongos albinos, Suíços, pesando de 25 a 35 gr, e ratos norvegicus, com aproximadamente 180 gr; todos machos, fornecidos pelo Biotério do Instituto Evandro Chagas e alocados no Biotério Setorial do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará.

Foram mantidos em gaiolas plásticas (39x32x16 cm), com forração de serragem sob temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luz de 6:00 às 18:00 horas), tendo água e ração “ad libitum”. Para minimizar as influências circadianas, todos os experimentos foram realizados no período da manhã. Os grupos experimentais foram sempre de 10 animais/tratamento.

2. DROGAS/SOLUÇÕES:

Para a realização dos experimentos foram utilizados morfina, ácido acético, formalina, carragenina, indometacina que foram preparados com solução salina (NaCl 0,9%), obtidas da Sigma Aldrich. Os extratos etanólicos de diferentes espécies de *Pouteria* (cedidos gentilmente pelo Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Brasília) foram preparados com água destilada. A via de administração escolhida foi a oral (v.o.) para os extratos e a intraperitoneal (i.p.) para as drogas, com exceção da formalina, que foi administrada subcutaneamente (s.c.). O volume administrado foi de $100\mu\text{l}/10\text{ g}$ de peso do animal.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

a) Determinação da toxicidade aguda:

Para esta determinação, foram utilizados camundongos ($n = 10$), em jejum de 12 horas, que receberam por via oral, através de uma cânula orogástrica, as doses de 100, 500 e 1.000 mg/kg do EEPr. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas, com ração e água “ad libitum”, e observados durante 72 horas. Após esse período de tempo, o número de mortes de cada grupo foi

expresso como o percentual do número total de animais injetados. A dose que foi utilizada nos demais experimentos foi determinada pelo padrão de toxicidade do presente extrato.

b) Avaliação da atividade antinociceptiva:

Teste das contorções induzidas por ácido acético:

O teste das contorções abdominais tem como objetivo determinar a atividade antinociceptiva periférica. Seguimos o modelo proposto por Vander Wende e Margolin (1956) para ratos, e modificado por Koster e cols. (1959) para camundongos. O teste consistiu em observar os números de contorções abdominais, acompanhadas pela extensão de, pelo menos, uma das patas traseiras (indício da sensação dolorosa). Os animais em jejum (n=10/tratamento) de 12h, receberam água destilada, indometacina ou diferentes doses dos extratos de *Pouteria*, por v.o. (figura 6a), e depois de 1h foram administrados por via i.p. ácido acético (1% v/v) 100µl/10 g de peso de animal (figura 6b), seguindo-se a contagem do número de contorções abdominais durante 30 minutos, tempo esse contado a partir da injeção do ácido (figura 6c).

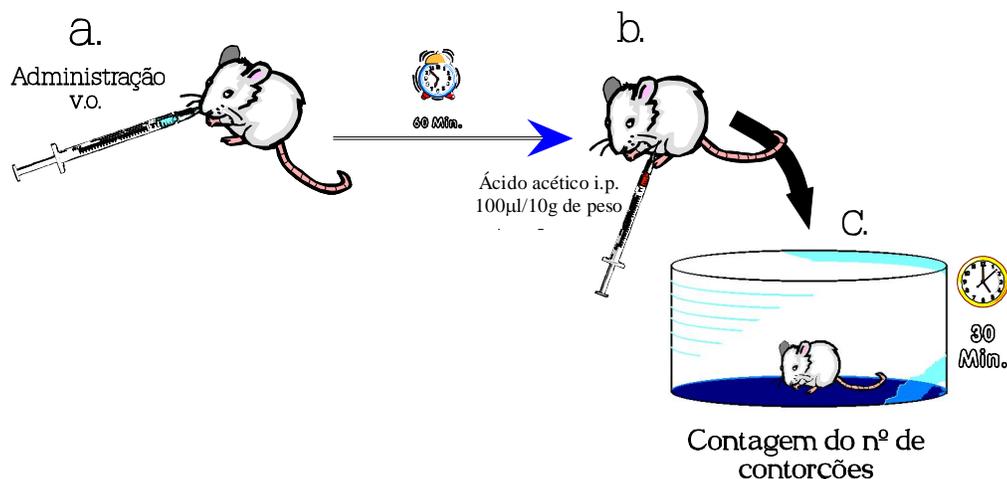


Figura 6 – Teste das contorções induzidas pelo ácido acético

Teste da placa aquecida:

Este teste, proposto por Wolff e McDonald (1944) e modificado por outros pesquisadores (Carlini, 1973), presta-se à avaliação da atividade antinociceptiva em nível central. Consiste em expor camundongos ao estímulo térmico nocivo (placa aquecida $55 \pm 0,5$ °C) e observar quantos segundos os animais levam para manifestar uma reação (lamber as patas anteriores ou saltar da placa) ao estímulo térmico, considerando uma latência máxima de 30 segundos para evitar queimaduras nas patas. No processo de seleção dos animais, foram desprezados aqueles que apresentaram latência acima de 8 segundos. Os grupos (n= 10/tratamento), receberam, por v.o., água destilada ou diferentes doses de EEP (figura 7), meia hora antes da exposição. A morfina (10 mg/kg) foi administrada por via s.c. e os animais foram imediatamente expostos ao estímulo nocivo. O registro do tempo de reação foi realizado a cada 30 minutos, durante 3h.

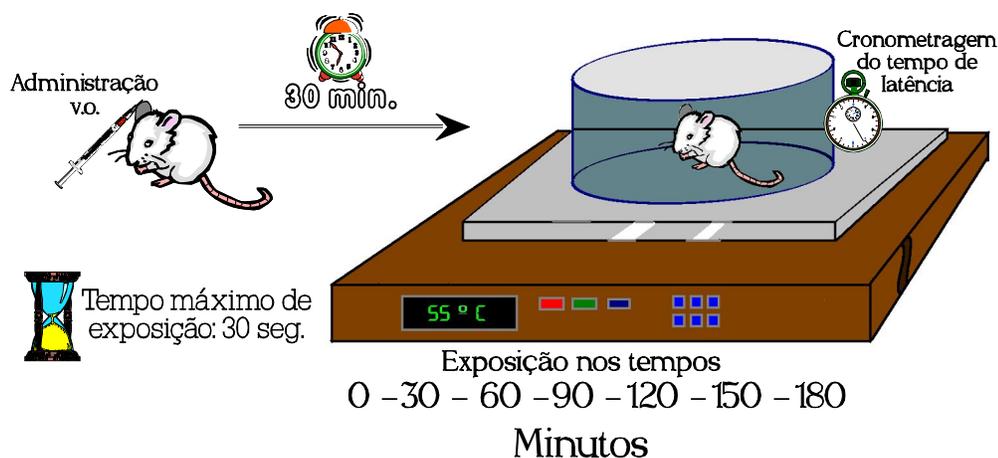
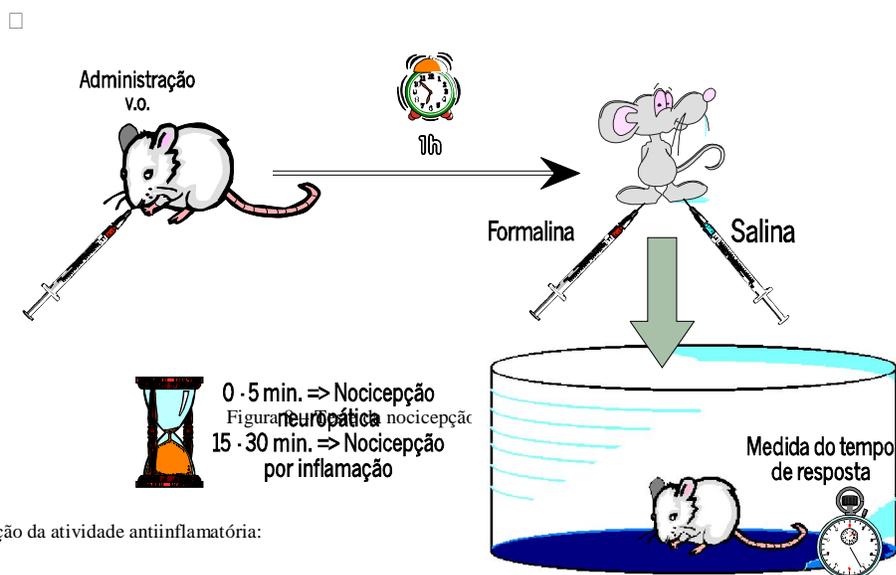


Figura 7 – Teste da placa quente

Nociceção induzida pela formalina:

Proposto por Hunskaar e cols. (1985) e revisto por Tjolsen e cols. (1992), consiste na indução da nociceção pela injeção intraplantar de 20 μ l de formalina e salina na região intraplantar da pata posterior direita e esquerda de camundongos, respectivamente. Em seguida, os animais pré-tratados (1 hora) com indometacina (padrão), salina (controle) ou os extratos, foram colocados, individualmente, em câmaras de observação, sendo cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo (indicativo de nociceção) a pata injetada com formalina (figura 8). Os tempos estipulados dentro dos primeiros 30 minutos, foram os de 0 – 5 minutos (estimulação neurogênica da nociceção) e de 15 – 30 minutos (nociceção de origem inflamatória).



c) Avaliação da atividade antiinflamatória:

IV. Preparação da bolsa de ar e inflamação local:

A bolsa de ar foi produzida seguindo o método de TAO e cols. (1999), modificado por Bastos (2004), com a administração subcutânea, em ratos *novergicus* (n = 5), de 20 ml de ar na região interescapular e reinflada com 10 ml de ar no 3º e 6º dia após o início do experimento. No 9º dia os animais foram pré-tratados, com 50 ou 100 mg/kg do EEP_r (v.o.), salina (controle), ou 10 mg/kg de indometacina na bolsa. Uma hora depois, deu-se o tratamento com carragenina 1% m/v – agente flogístico – numa dose de 100 mg/Kg, diluída em solução salina. Os animais foram sacrificados 16h após administração do agente flogístico. Este experimento teve como objetivo verificar o volume e produção de exsudato (figura 9).

Cultura de células do exsudato inflamatório:

Após o processo de inflamação com carragenina, foram retiradas alíquotas de 150 µl, do exsudato, para serem cultivadas. Os exsudatos foram incubados em DMEM (Dubelco Modified Eagle Medium, D5280, Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal (10270-106, GIBCO), e com 25000µg/L penicilina e 25000 U/L estreptomicina (15140-122, GIBCO). As amostras foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços previamente tratadas com poli-L-lisina (PLL 100µg/ml; P5899, Sigma). As culturas foram mantidas em estufa com uma atmosfera formada por 5% CO₂ e 95% O₂ a 37°C.

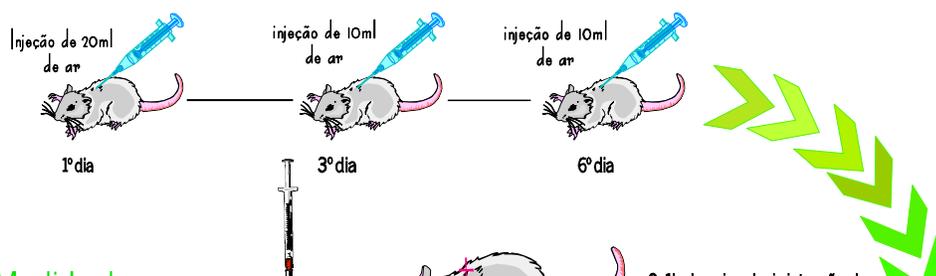


Figura 9 – Modelo de inflamação local: Bolsa de ar

Análises bioquímicas

☞ Medida da atividade de Adenosina Desaminase (ADA)

A atividade da ADA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Rodrigues e cols. (1994), baseado na formação do indofenol de coloração azul, mediante a reação da amônia liberada pelo catabolismo enzimático, em incubação prévia de 1 hora com 0,05M de substrato (adenosina) e 500µl de exsudato diluído 1:2 em salina, com soluções de hipoclorito alcalino e fenol. Além de tais soluções, também foi utilizada a solução padrão de sulfato de amônio $7,5 \times 10^{-5}$ M. Desta reação, como produto, foi obtido indofenol, que foi medido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 460 nm. A atividade da ADA foi expressa em U/L.

☞ Ensaio de Nitrito

O ensaio de nitrito foi realizado de acordo com o modelo de Green e cols. (1982) pela adição de reagente de Griess no material a ser analisado. Este reagente foi preparado pela mistura de volume equivalente de solução de naftiletileno a 0,1% com a solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5%. Um volume de 500 µl de amostra (retirado da cultura de exsudato) foi

misturado com o mesmo volume de reagente de Griess. O resultado da reação foi a coloração rosa púrpura do meio. Esta foi, posteriormente, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de nitrito foram determinadas pela comparação com os resultados obtidos pela curva padrão de diluições seriadas de nitrito de sódio.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados de todos os experimentos foram expressos como média±e.p.m. As diferenças entre os grupos foram realizadas baseando-se na Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo *post hoc* de Tukey ou Dunnett, de acordo com cada caso. Foram considerados como significância estatística os resultados que apresentaram $p < 0.05$. Os testes *post hoc* utilizados variaram de acordo com cada tipo de experimento, baseando-se no número de amostra e/ou os tipos de comparações feitas, em relação aos respectivos controles.

IV. RESULTADOS

1. TOXICIDADE AGUDA

Foram realizados os experimentos com as doses de 100, 500 e 1000 mg/kg do EEPr, apresentando um padrão segundo mostrado na tabela abaixo. A partir dos resultados obtidos, foi utilizada, como dose padrão para os demais experimentos, 10% da dose na qual começou-se a observar mortes (1000mg/kg). Foi obtida, desta forma, uma boa margem de segurança, uma vez que normalmente é utilizada a dose correspondente a 10% da DL50.

Toxicidade aguda do EEPr:

<i>Dose (mg/Kg)</i>	N° de mortes	%
100	0	-
500*	0	-
1000*	2	20

* Alterações fisiocomportamentais, como: sudorese excessiva, baixa atividade, aumento da micção e sonolência.

2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EEP_r.

a) Efeitos do EEP_r sobre o estímulo nociceptivo induzido pelo ácido acético.

Neste estudo foram utilizadas as doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg (dose padrão obtida a partir do estudo da toxicidade aguda) de EEP_r, administradas 60 minutos antes da injeção de ácido acético. Na dose de 50 mg/kg, foi observada uma redução significativa do número de contorções em relação ao controle, produzindo valores semelhantes aos do padrão indometacina. Ao aumentar a dose para 100 mg/kg foi observado um bloqueio total das contorções induzidas pelo ácido acético (ver gráfico 1).

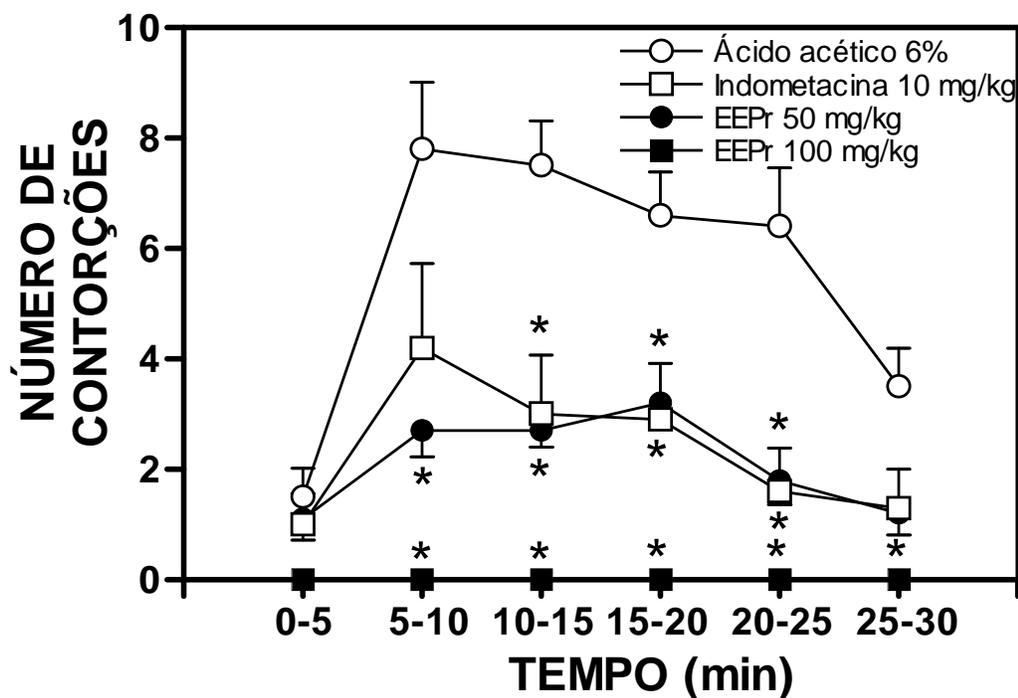
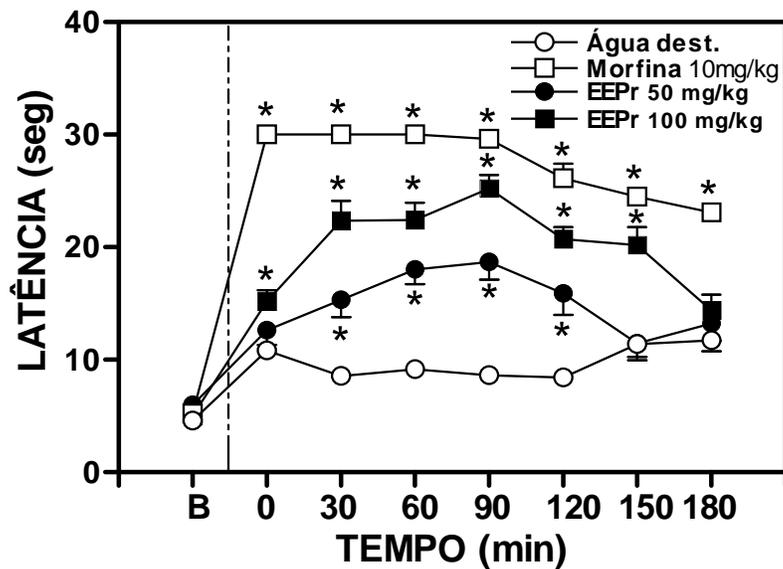


Gráfico 1 – Efeito do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os resultados representam a média±e.p.m de 10 animais. *p<0,05 representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com ácido acético nos respectivos tempos (Teste de Tukey).

b) Efeitos do EEPr sobre o estímulo térmico nocivo:

EEPr foi capaz de aumentar o tempo de permanência dos animais na placa aquecida a 55 ± 5 °C, tanto na dose de 50 mg/kg quanto na dose de 100 mg/kg, descrevendo uma relação dose efeito, como mostrado no gráfico abaixo. A dose de 50 mg/kg exerceu uma atividade antinociceptiva nos tempos 30 ($15,31 \pm 1,53$ s), 60 ($18,00 \pm 1,27$ s), 90 ($18,68 \pm 1,58$ s) e 120 min. ($15,89 \pm 1,90$ s), com significativa diferença estatística em relação ao controle (0 = $10,81 \pm 0,51$ s; 30 = $8,56 \pm 0,53$ s; 60 = $9,16 \pm 0,59$ s; 90 = $8,62 \pm 0,52$ s; 120 = $8,41 \pm 0,62$ s; 150 = $11,40 \pm 1,44$ s; e 180min. = $11,71 \pm 0,95$ s). A dose de 100 mg/kg produziu uma atividade antinociceptiva desde o tempo 0 ($15,20 \pm 0,97$ s) – 30 min após a administração dos respectivos tratamentos; seguindo pelos tempos 30 ($22,36 \pm 1,74$ s), 60 ($22,43 \pm 1,52$ s), 90 ($25,22 \pm 1,21$ s), 120 ($20,71 \pm 1,07$ s), 150 ($20,17 \pm 1,62$ s) e 180 ($14,38 \pm 1,39$ s).

Gráfico 2 – Influência do estímulo térmico na atividade antinociceptiva do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* em camundongos, avaliada no Teste da placa aquecida, a 55°C. Os resultados representam a média±e.p.m de 10 animais. *p<0,05 representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com água destilada nos respectivos tempos (Teste de Tukey). B=basal dos animais obtido antes de iniciar a administração com os respectivos tratamentos.



c) Efeitos do EEPr sobre o estímulo nociceptivo induzido pela formalina:

Neste estudo, o EEPr foi administrado 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 2,5%. A dose de 50 mg/kg, como apresentado no gráfico 3, não promoveu uma redução significativa na nocicepção neurogênica (0-5 min) – $0,87 \pm 0,12$ min. Em relação ao controle ($0,99 \pm 0,14$ min.), mas promoveu uma redução de 78% no tempo de lambda na pata direita dos animais, na fase inflamatória (Controle = $1,10 \pm 0,29$ min.). A dose de 100mg/kg interferiu de forma significativa, reduzindo a resposta à nocicepção tanto na fase neurogênica (redução de 47%), quanto na fase inflamatória (redução de 91%). Os resultados mostraram uma relação dose efeito para o EEPr.

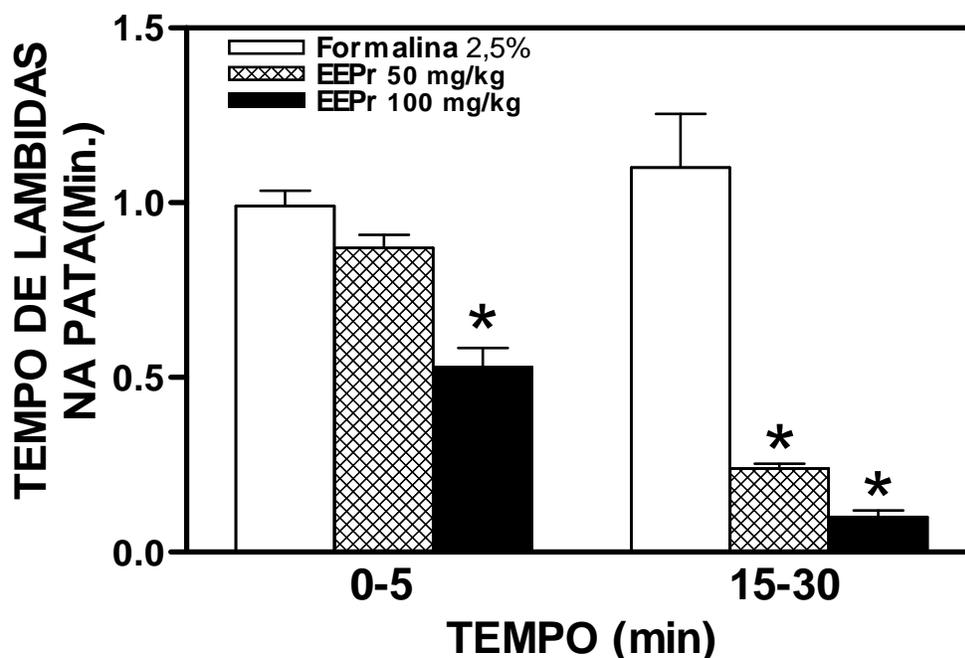


Gráfico 3 – Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* em camundongos no Teste da formalina. 0-5 min representa a primeira fase (neurogênica); 15-30 min representa a segunda fase (inflamatória). Os resultados representam a média±e.p.m de 10 animais. * p<0,05 representa significância estatística em relação aos animais controles injetados com formalina (Teste de Dunnet).

3. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EEPr

Este estudo foi realizado através da técnica da bolsa de ar, a partir da qual se fez a coleta de exsudato inflamatório para a realização dos experimentos a seguir:

- a) Efeito do EEPr sobre a ativação e migração celular:

Contagem e cultura de células:

Para avaliar os efeitos do EEPr sobre a migração celular, amostras de exsudato foram diluídas 1:100 e realizada a contagem de células (leucócitos) em câmara de Neubauer. Observamos uma expressiva inibição pela droga nas concentrações de 50 e 100 mg/Kg, ou seja, uma inibição de 65 e 81% (controle= 43, 83 ± 1,00), respectivamente, enquanto a indometacina (10mg/kg) reduziu 57% (gráfico 4).

Em cultura observou-se a evidente redução do número de células no exsudato inflamatório, como mostrado na figura 10.

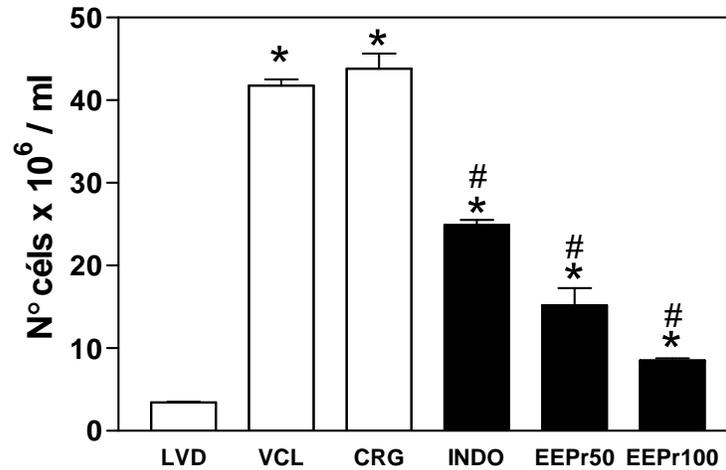


Gráfico 4 – Efeito do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* sobre o número de células presentes no exsudato inflamatório. Os resultados representam a média±e.p.m de 04 animais. * $p < 0,05$ representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com água destilada; # representa a significância estatística em relação aos animais controles tratados com Carragenina (Teste de Tukey). LVD= lavado(salina injetada na bolsa no lugar da carragenina); VCL = veículo (água destilada v.o.); CRG= carragenina injetada na bolsa; INDO= indometacina;

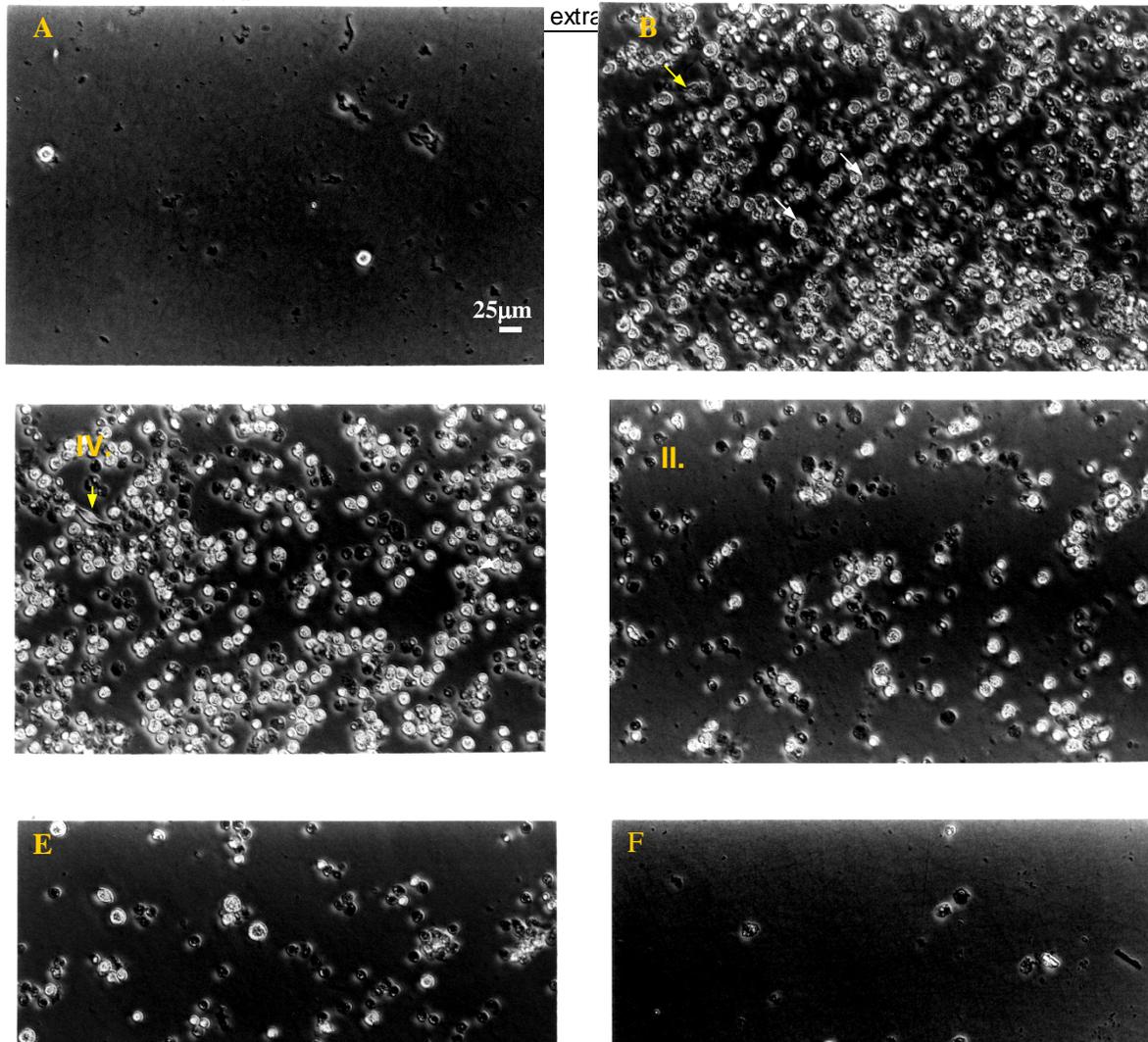


Figura 10 – Cultura de exsudato inflamatório

(A) Representa o grupo experimental que recebeu salina na bolsa, em lugar de carragenina, onde não observamos desencadeamento de processo inflamatório. No grupo da carragenina (B), observa-se a abundância de células, sendo possível notar a presença de células vacuolizadas (seta branca), possivelmente macrófagos, e células aparentemente emitindo pseudópodes (seta amarela). A administração do veículo (salina), por via oral (C), não alterou a migração celular induzida pela carragenina. A indometacina - 10mg/kg (D), reduziu a migração celular. O tratamento com o EEP_r 50 mg/kg (E) e 100 mg/kg (F) resultou em uma diminuição significativa do número de células. A dose de 100mg/kg foi mais eficaz em inibir a migração celular, demonstrando uma possível atividade antiinflamatória.

* as culturas foram feitas a partir do exsudato, com alíquotas de 150µL semeadas em placas de 24 poços. Estas culturas foram mantidas com DMEM suplementado com soro bovino fetal (n= 2/ grupo).

b) Efeito do EEP_r sobre a atividade da Adenina Desaminase:

Na verificação da atividade da ADA presente no exsudato inflamatório, observamos que o EEP_r (50 mg/kg) promoveu uma redução de 68% dessa atividade enzimática, quando comparada com a atividade no grupo controle (carragenina= 74,44 ± 6,09). A dose de 100mg do EEP_r reduziu a atividade em 95%, enquanto a indometacina (10mg/kg) reduziu 67%.

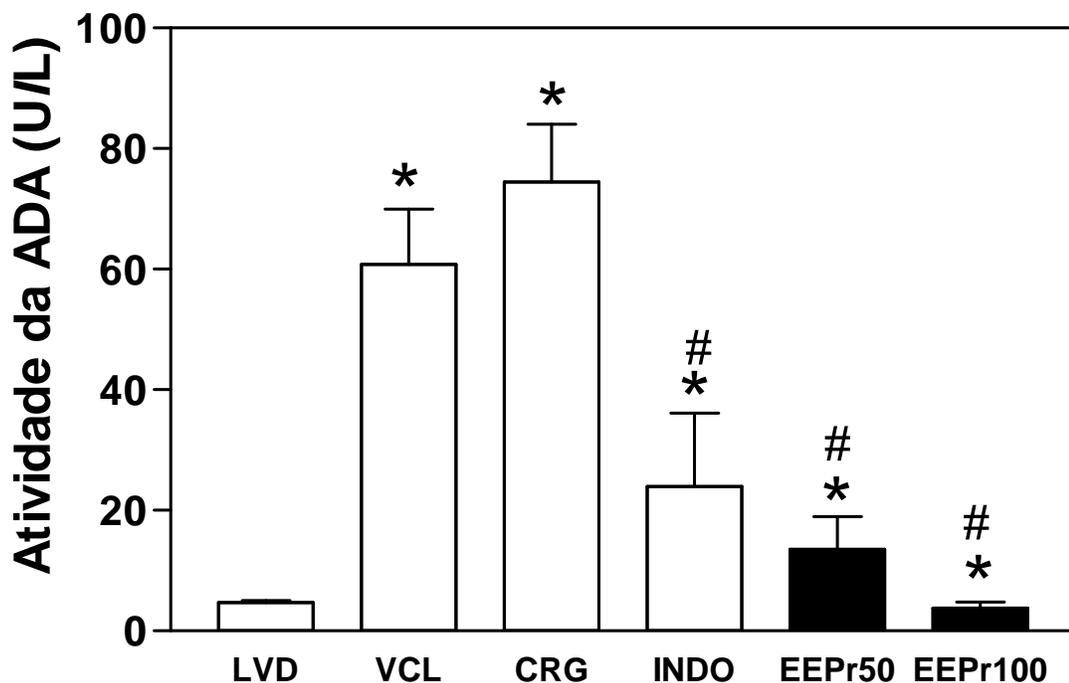


Gráfico 5 – Efeito do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* na atividade da enzima ADA. Os resultados representam a média±e.p.m de 04 animais. * p<0,05 representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com água destilada; # representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com Carragenina (Teste de Tukey). LVD= lavado(salina injetada na bolsa no lugar da carragenina); VCL = veículo; CRG= carragenina; INDO= indometacina; EEPr50 ou EEPr100= 50 ou 100 mg/kg de do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora*

c) Efeito do EEPr sobre a síntese de NO:

Com os sobrenadantes das culturas de exsudato inflamatório, foram realizadas medidas das concentrações dos metabólitos do NO (nitrito e nitrato), onde foi verificada também a diminuição da produção desses metabólitos (50mg/kg – 77%; 100mg/kg – 89%), em comparação com o grupo carragenina (253,25 ± 7,89). O padrão indometacina reduziu em 59% a concentração de NO₂/NO₃.

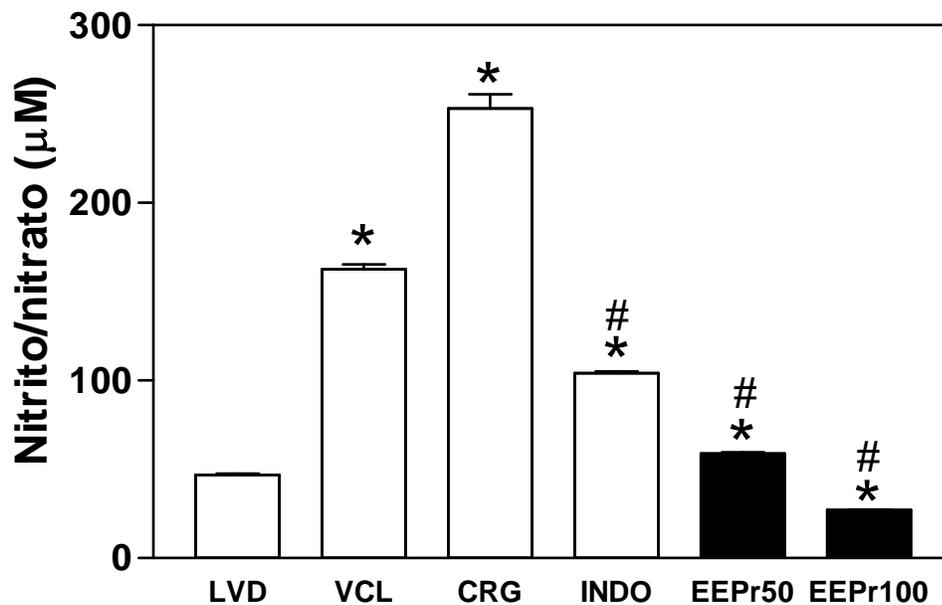


Gráfico 6 – Efeito do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* na síntese de NO em inflamação local. Os resultados representam a média±e.p.m de 04 animais. * p<0,05 representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com água destilada; # representa significância estatística em relação aos animais controles tratados com Carragenina (Teste de Tukey). LVD= lavado(salina injetada na bolsa no lugar da carragenina); VCL = veículo; CRG= carragenina; INDO= indometacina; EEPr50 ou EEPr100= 50 ou 100 mg/kg de do extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora*

V. DISCUSSÃO

Os resultados indicam que o EEPr apresenta uma excelente atividade antinociceptiva e antiinflamatória, como demonstrada pela total inibição das contorções abdominais (teste do ácido acético), aumento do limiar da dor (teste da placa aquecida), redução das respostas álgicas a um estímulo flogístico (teste da formalina) e capacidade de inibir a migração celular e ativação dos macrófagos (teste da bolsa de ar). Foi essencial empregar mais de um teste para confirmar as ações antinociceptivas, o uso dos três testes envolveram tanto estímulos nociceptivos visceral químico (ácido acético e formalina), quanto estímulos térmicos (placa quente), o que proporcionou uma melhor avaliação das propriedades que foram investigadas, permitindo observar o comportamento do extrato diante das várias formas de induzir a dor.

Levando em consideração que um dos maiores fatores limitantes do uso de novos fármacos é a baixa margem de segurança de toxicidade, os resultados obtidos podem ser considerados relevantes, pelo fato de que as doses usadas nesses experimentos não apresentaram qualquer tipo de toxicidade (alterações fisiocomportamentais) ou mortalidade, quando da avaliação nos testes de toxicidade aguda.

A pesquisa realizada indicou que o EEPr apresenta uma toxicidade aguda relativamente baixa, sendo que estes resultados não podem ser colocados como conclusivos, uma vez que, por carência de EEPr, não foi possível complementar os experimentos que forneceriam a DL₅₀ (Dose Letal para 50% de um grupo experimental). No entanto, a falta dessa informação não interferiu na avaliação

dos dados, pois os presentes resultados foram suficientes para sugerir a baixa toxicidade aguda do extrato e assegurar uma relativa segurança nos experimentos. Nos experimentos foram utilizadas doses correspondentes a 10% do que representaria a DL₂₀ (dose letal para 20% de um grupo experimental).

Apesar dos resultados dos três primeiros testes de analgesia terem sido importantes para avaliação da atividade analgésica, o que mais chamou a atenção foi a grande potência do extrato, na dose de 100 mg/kg, para bloquear as dores viscerais em 100%. Além de gerar uma resposta próxima àquela apresentada pela morfina diante de um estímulo térmico, mostrou também a grande potência do mesmo. Mediante a resposta bifásica obtida no teste da formalina, houve reforço ainda maior da atividade antinociceptiva do extrato em questão.

A analgesia, como é amplamente conhecida, pode ser obtida por interferências tanto nos mecanismos bioquímicos periféricos quanto centrais. Nos periféricos, inibindo a formação e/ou liberação de mediadores químicos envolvidos na cascata da inflamação, interferindo desta forma com os mecanismos de facilitação, a hiperalgesia primária (Vane e cols., 1998). Nos centrais, atuando sobre a neurotransmissão nociceptiva, de forma a estimular as vias moduladoras da dor e nocicepção, ativando fibras neuronais inibitórias serotoninérgicas e/ou opióides, agindo diretamente sobre os receptores opióides amplamente distribuídos desde neurônios periféricos até o SNC, ou ainda bloqueando receptores e obstruindo vias importantes para a transmissão e facilitação do estímulo doloroso (Collier, 1963; Melzack e Wall, 1965; Sora e cols., 1997; Rang e cols, 2003).

Os mecanismos periféricos de analgesia são geralmente associados aos efeitos semelhantes aos dos antiinflamatórios não esteroidais (AINES). A atuação do extrato inibindo as contorções abdominais induzidas por ácido acético, que envolve de forma significativa as PGE₂ e PGF_{2α} no fluido peritoneal (Gyres e Knull, 1975; Deraedt e cols., 1980; Vane e cols., 1998), sugere sua atuação na inibição da síntese de PGs, conhecidamente o principal mecanismo das drogas disponíveis para o uso clínico.

Levando em consideração que os AINEs promovem este efeito, tanto em nível periférico quanto central, combatendo assim os processos de dor, febre e inflamação (Hardman e cols., 2003; Koppert e cols., 2004), por impedirem a ligação do ácido aracdônico ao seu sítio de ligação na COX, alguns se ligando de forma covalente, como o ácido acetilsalicílico, em sítios específicos do canal da enzima, ou de forma não covalente – maioria dos casos (Frölich, 1997; Vane e Botting, 1998; Vane e cols., 1998). É possível que o EEPr possa exercer mecanismo(s) semelhante(s), entretanto são necessários estudos mais aprofundados para reforçar esta hipótese.

Foi observado que o extrato apresentou uma atividade periférica superior a da droga padrão (indometacina 10 mg/kg), devendo-se, assim, atentar para outros possíveis mecanismos para sua atuação, incluindo a investigação de possíveis atividades tipo esteróidal (atuação em um nível mais elevado na cadeia de síntese de PGs e/ ou ação sobre a liberação de outros mediadores inflamatórios) e indicando também estudos de sua atividade sobre os vários mediadores dos processos da hiperalgesia primária, entre os quais podemos citar bradicinina, NO, interleucinas e neurotransmissores que modulam este mecanismo periférico.

Sabe-se que a primeira fase do teste da formalina (neurogênica: 0-5min) é comandada por mecanismos centrais. A solução de 2,5% de formol é capaz de promover dor por estímulo direto de nociceptores nas FAPs e conseqüente liberação de SP e/ ou bradicinina (Hunskaar e cols., 1985; Tjolsen e cols., 1992). Vários resultados experimentais indicam que a formalina ativa diversos tipos de FAPs, inclusive fibras C. Nesta primeira fase, gera um estado de dor persistente (Heapy e cols., 1987). A segunda fase (inflamatória: 15-30 min) é comandada por autacóides, incluindo HA, 5-HT, PGs, cininas, entre outros (Shibata e cols., 1989). O EEPr diminuiu o tempo de lambda nas patas, em ambas as fases, isto pode sugerir uma dualidade de seu efeito, ou seja, ele é um potente agente tanto sobre os mecanismos centrais, como sobre os mecanismos periféricos da dor.

Quanto aos aspectos centrais, o extrato foi ativo nas fases neurogênica e inflamatória no teste da formalina, o que pode ser indicativo de associação com o sistema opióide (Hunskaar e cols., 1985; Vaz e cols., 1996). É bem sabido que a morfina produz efeito analgésico por ativar receptores opióides μ , κ e δ (Sora e cols., 1997). Muitos estudos farmacológicos sugerem que os receptores do tipo μ sejam o maior alvo para o sítio de ação da morfina (Loh e Smith, 1989). Não obstante, a analgesia pode ser obtida por substâncias que ativem diretamente estes receptores ou estimulem a liberação de substâncias opióides endógenas. Diante dessas informações, houve o cuidado em usar a morfina como controle positivo nos experimentos envolvendo estímulos térmicos. Observou-se também que o EEPr apresentou um efeito analgésico próximo à resposta máxima induzida pela morfina, mostrando a grande potência na inibição da via nociceptiva apresentada por ele.

Apesar dos mecanismos de ação, que justificam os efeitos analgésicos centrais do EEPr ainda estarem em fase de investigação, é de interesse saber se, de fato, as ações são de natureza opióide e/ou envolve acetilcolina e outros agentes. O uso de antagonistas, como, por exemplo, a naloxona ou atropina podem fortalecer essa hipótese.

Sabe-se que, apesar de ser o mecanismo mais visado na clínica, a influência sobre as vias opioidérgicas não são a única fonte de analgesia central, mas também pode ser promovida por mediadores tipo GABA, adenosina, que particularmente mereceria atenção, uma vez que tem sido amplamente observado analgesia por bloqueio de receptores de adenosina (Milan, 1999). Desta forma, tornam-se importantes futuros estudos da influência do EEPr sobre as vias de condução da dor, como sua influência sobre receptores de glutamato, adenosina, liberação de SP e sobre vias inibitórias correlacionadas.

Os resultados obtidos na segunda fase do teste da formalina chamaram a atenção para as prováveis propriedades antiinflamatórias que o extrato poderia apresentar. Dentro do modelo experimental de inflamação local induzida por carragenina em ratos, foi observado que o EEPr inibiu significativamente o desenvolvimento do processo inflamatório. Tais resultados, somados aos obtidos no teste da formalina, sugeriram uma potente atividade antiinflamatória, uma vez que os dados utilizando a dose de 100 mg/kg superaram a droga padrão indometacina. Em virtude disso, foi aberto um vasto leque de opções para a pesquisa de mecanismos pelos quais ele age.

Tendo o conhecimento de que a carragenina é um potente agente flogístico, e que tem como principal ação a indução da síntese de PGs, que por

sua vez, ao ativar FAPs, promovem uma liberação periférica de NO e migração de células de defesa, com seqüente liberação de mediadores inflamatórios no tecido agredido, constitui-se um padrão de desenvolvimento de processo inflamatório.

O processo inflamatório, como se sabe, depende, basicamente, da síntese e liberação de mediadores químicos, envolvendo tanto a participação de enzimas teciduais quanto de células de defesa, partindo de uma lesão ou dano tecidual. O processo de diapedese é de grande relevância, dentro do processo inflamatório, pois através deste, os mastócitos, assim como linfócitos e macrófagos, podem chegar até o tecido agredido e, mediante estímulos químicos, liberar os diversos mediadores do processo inflamatório, os quais tendem a potencializá-lo (Furchgott, 1993; Robbins 2000).

O NO, possuidor de atividade vasodilatadora, por atuar sobre a síntese de GMPc, facilita o processo de diapedese e o extravasamento plasmático. Logo, a inibição da NOS, mais especificamente a eNOS, promove uma inibição da migração celular pela redução da vasodilatação. Por outro lado foi observado também indícios de inibição da atividade fagocítica dos macrófagos (dado não conclusivo) que também é dependente de NO, neste caso, envolveria a isoforma iNOS (Furchgott, 1993; Robbins 2000; Medeiros e cols., 2004).

Reforçando os dados da literatura, o EEP_r promoveu reduções de 65% (50 mg/kg) a 81% (100 mg/kg) na migração celular. Estes resultados foram respaldados pela significativa redução da concentração de NO₃⁻/ NO₄⁻ (derivados do metabolismo do NO) no exsudato inflamatório, o que indica uma possível ação inibitória da iNOS e eNOS, sugerindo ainda um dos possíveis mecanismos de sua atividade antiinflamatória, pois ao impedir a migração celular e o extravasamento plasmático ele impede a potencialização do processo inflamatório.

O fato de ser observada uma redução significativa na migração de células da corrente sanguíneas para os tecidos, sugere que esta não seja unicamente produzida pela inibição da eNOS, mas, provavelmente, também pela inibição de outros mediadores químicos envolvidos neste processo. Entre os mais importantes, que facilmente pode estar envolvida, é a PGI₂, que é outro forte concorrente para a vasodilatação, por promover o relaxamento da musculatura lisa dos vasos, via inibição da síntese de AMPc, reforçando, portanto, a sugestão da atuação do EEP_r sobre a COX, quer por ação direta, ou seja, bloqueado o sítio de ligação desta ao ácido araquidônico, ou indireta, pela simples retirada do efeito indutivo da síntese de COX₂ promovido pelo aumento da concentração do NO no momento da inflamação (Bakhle e Botting, 1996; Perkins e Dray, 1996; Wagner e cols., 1998).

A redução do número de células no exsudato inflamatório pode ser devido à diminuição da diapedese pela inibição da eNOS, mas também pela redução da atividade de enzima ADA, mais especificamente isoenzima ADA₁, que, conhecidamente, em processos inflamatórios ou sob estímulo mitótico, é componente fundamental para a proliferação de linfócitos da linhagem B e T (Hovi e cols., 1976; Resta e Thompson 1997).

Uma vez que, o EEP_r inibiu a atividade desta enzima, conseqüentemente, promoveu uma inibição da atividade proliferativa dos linfócitos, somando isto à inibição da diapedese, efeito notadamente promovido pelo extrato, pode-se justificar uma redução número de células linfocíticas no exsudato.

Esses resultados parecem reforçar ainda mais aqueles em que o EEP_r nas doses de 100 e 300 mg/kg inibiram o edema induzido por carragenina em pata de rato. Essas mesmas doses inibiram o aumento da permeabilidade vascular

induzida por carragenina i.p.; além de ter sido também inibido o recrutamento leucocitário induzido por carragenina, lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e leucotrieno B4 (LTB4) (Nunes, 2004).

Portanto, observamos que o EEP_r promove uma redução marcante na dor de origem inflamatória, possivelmente por agir em pontos-chaves da inflamação: 1) na provável inibição da síntese de PGs; 2) na inibição da síntese de NO e 3) Inibição da ADA, além de interferir nos mecanismos inflamatórios envolvidos nos estudos de Nunes (2004). A sua ação potente sobre estes mediadores inibe a ocorrência de diversas etapas da cascata inflamatória, promovendo, como observado na cultura do exsudato inflamatório, um ambiente semelhante ao que recebeu veículo inerte.

VI. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados, foi possível observar que o EEPr apresenta grande eficácia nas atividades antinociceptiva e antiinflamatória, uma vez que o EEPr:

1. Nas doses de 50 e 100mg/kg, inibiu de forma significativa as contorções induzidas por ácido acético 1%, com atividade superior a apresentada pela indometacina (10 mg/kg);
2. Na indução de nocicepção por estímulo térmico, aumentou o limiar para dor, nas doses de 50 e 100mg/kg. Esta última se aproximou ao efeito da morfina 10 mg/kg.
3. No teste da formalina, na dose de 50mg/kg, inibiu significativamente a 2ª fase, enquanto na dose de 100mg/kg inibiu a 1ª e 2ª fases.
4. Nas doses de 50 e 100 mg/kg, inibiu significativamente a migração celular e no modelo de inflamação induzida por carragenina, promovendo uma potente redução na concentração de NO, sendo inclusive mais potente que a indometacina.
5. Nas doses de 50 e 100 mg/kg, promoveu uma potente redução da atividade da enzima adenosina desaminase, sendo também mais potente que a indometacina.

Em conjunto, os resultados mostram a importância de que futuras investigações dos mecanismos moleculares das atividades antinociceptiva e antiinflamatória, apresentadas pelo EEPr, sejam levadas em questão.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Ativação dos linfócitos T. *In: Imunologia Celular e Molecular*. 4^a ed., ED Revinter, Rio de Janeiro, 2003.
- ABBOTT FV, HONG Y, BLIER P. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, 35: 99-110, 1996.
- ALBAGLI S. *Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade*. *Parcerias Estratégicas*, 12: 5-19, 2001.
- ANTAL M, PETKO M, POLGAR E, HEIZMANN CW, STORM-MATHISEN J. Direct evidence of an extensive GABAergic innervation of the spinal dorsal horn by fibres descending from the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience.*, 73: 509-18, 1996.
- ARVIDSON U, DADO RJ, RIEDL M, LEE JH, LAW PY, LOH HH, ELDE R, WESSENDORF MW. Delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J Neurosci.*, 15: 1215-35, 1995.
- BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Med. Inflammation*, 5: 305-323, 1996.
- BARDIN L, COLPAERT FC. Role of spinal 5-HT(1A) receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *Eur J Pain.*, 8: 253-61, 2004.
- BASTOS GNT. Efeito antiinflamatório e antinociceptivo de *Physalis angulata* (camapu) em ratos: inibição da PGE2 e óxido nítrico. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, 99 p, 2004.
- BEAR MF, CONNORS BW, PARDISO MA. *Neuroscience: Exploring the Brain*, 2nd edition, Lippincott, Williams and Wilkins, 2001.

- BEICHE F, SCHEUERER S, BRUNE K, GEISSLINGER G, GOPPELT-STRUEBE M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett.*, 390:165-169, 1996
- BERG MEVD. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. rev. e. aum. Belém: MPEG, 207 p. Il, 1993.
- BESSON JM, CHAOUCH A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, 67: 67-186, 1987.
- BESSON JM. The neurobiology of pain. *The Lancet*, 353: 1610-1615, 1999.
- BILEVICIUTE I, THEODORSSON E, LUNDEBERG T. Effects of histamine on neuropeptide release into the knee joint perfusate and cerebrospinal fluid in rats. *Neurosci Lett*, 18: 9-12, 1997.
- BLAND-WARD PA, HUMPHREY PP. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. *Br J Pharmacol.*, 122: 365-71, 1997.
- BOIE Y, STOCCO R, SAWYER N, SLIPETZ DM, UNGRIN MD, NEUSCHAFER-RUBE F, PUSCHEL GP, METTERS KM, ABRAMOVITZ M. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.*, 340:227-241, 1997.
- BORRÁS MRL. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? *Ed. Valer*, 2003.
- BOUVIER MM, EVANS ML, BENHAM CD. Calcium Influx Induced by Stimulation of ATP Receptors on Neurons Cultured from Rat Dorsal Root Ganglia. *Eur J Neurosci.*, 3: 285-291, 1991.
- BOWSER D. Mechanisms of pain in man. Publicado por ICI *Pharmaceutical division*, Cheshire, England, 7-13, 1987.
- BREDER CD, DEWITT D, KRAIG RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol.*, 355: 296-315, 1995.

- BREDT DS, SNYDER SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron.*, 13: 301-13, 1994.
- BURNSTOCK G, WOOD JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol.*, 6: 526-32, 1996.
- CAO YQ, MANTYH PW, CARLSON JE, GILLESPIE A-M, EPSTEIN JC, BASBAUM AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, 392: 390-394, 1998.
- CARLINI ELA. Farmacologia sem aparelhagem. São Paulo: *Ed. Sarvier*, 192, 1973
- CERVERO F, LAIRD JAM. Visceral pain. *The Lancet*, 353: 2145-2148, 1999.
- CERVERO F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev*, 74:95-138, 1994.
- CESARE P, McNAUGHTON P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *PNAS.*, 93:15435-15439, 1996.
- COGGESHALL RE, CARLTON SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res.*, 24: 28-66, 1997.
- COHEN RH, PERL ER. Chemical factors in the sensitization of cutaneous nociceptors. *Prog Brain Res.*, 74: 201-206, 1988.
- COLLIER HOJ. A pharmacological analysis of aspirin. *Adv. Pharmacol. Chemothor.*, 7: 333-405, 1963.
- COLLO G, NORTH RA, KAWASHIMA E, MERLO-PICH E, NEIDHART S, SURPRENANT A, BUELL G. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.*, 16: 2495-507, 1996.

- COLVILLE-NASH PR, GILROY DW. COX₂ and the cyclopentenone prostaglandins a new chapter in the book of inflammation? *Prost Other Lip Mediat.*, 62: 33-43, 2000.
- CONLON BA, LAW WR. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol.*, 138: 14-20, 2004.
- CORRÊA JÚNIOR C, LIN CM, SCHEFFER MC. Cultivo das plantas medicinais aromáticas e condimentares. 1^a. Ed. Curitiba: EMATER, p. 166-167, 1991.
- DERAEDT R, JUONQUEY D, DELEVALÉE F, FLAHAUT M. Release of prostaglandins E and F in an agogenic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.*, 61: 17-24, 1980.
- DI STASI LC. Arte, ciência e magia In: Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, p. 15-21, 1996.
- DRAY A, URBAN L. New pharmacological strategies for pain relief. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 36: 253-80, 1996.
- DUSSOR GO, HELESIC G, HARGREAVES KM, FLORES CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain.* 107: 22-32, 2004.
- FERREIRA SH, LORENZETTI BB, POOLE S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1227-1231, 1993.
- FISHER K, LEFEBRE C, CODERRE TJ. Antinociceptive effects following intrathecal pretreatment with selective metabotropic glutamate receptor compounds in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol. Bioch. And Behav.*, 73: 411-418, 2002.
- FRÖLICH JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci.* 18: 30-34, 1997.

- FURCHGOTT RF. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 22 Suppl 7:S1-2,1993.
- GOODWIN DC, LANDINO LM, MARNETT LJ. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J*, 13:1121-36, 1999.
- GRAÇA C. Fitoterapia em atenção primária. Curitiba: Secretaria Municipal de saúde, p. 15 (apostila), 1990.
- GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126:131-8, 1982.
- GRUBB BD, MCQUEEN DS, IGGO A, BIRRELL GJ, DUTIA MB. A study of 5-HT receptors associated with afferent nerves located in normal and inflamed rat ankle joints. *Agents Actions* 25: 216-218, 1988.
- GUILBAUD G, BENOIST JM, ESCHALIER A, GAUTRON M, KAYSER V. Evidence for peripheral serotonergic mechanisms in the early sensitization after carrageenin-induced inflammation: electrophysiological studies in the ventrobasal complex of the rat thalamus using a potent specific antagonist of peripheral 5-HT receptors. *Brain Res.*, 502: 187-197, 1989.
- GYRES K, KNULL J. Inflammation and writhing syndrome inducing effect of PGE₁, PGE₂ and the inhibition of these actions. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 27: 257-264, 1975.
- HALL JM. Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol.*, 28:1-6, 1997.
- HANDWERKER HO, KOBAL G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev.*, 73: 639-671, 1993.
- HARDMAN JG, LIMBIRD LE, GOODMAN e GILMAN A. (Godman & Gilman): The pharmacological basis of therapeutics. 10^a ed. Macgraw-Hill, p. 576, 2003.

- HAY C, BELLEROCHÉ J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport*, 24:1249-1251, 1997.
- HEAPY CG, JAMIESON A, RUSSELL NJW. Afferent C-fibre and A-delta activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 90: 164, 1987.
- HILL SJ, GANELLIN CR, TIMMERMAN H, SCHWARTZ JC, SHANKLEY NP, YOUNG JM, SCHUNACK W, LEVI R, HAAS HL. International union of pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmac. Rev.*, 49: 253- 278, 1997.
- HÖGLUND AU, BAGHDOYAN HA. M2, M3 and M4, but not M1, muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord. *JPET*, 281:470-477. 1997
- HOLSTEGE JC, VAN DIJKEN H, BUIJS RM, GOEDKNEGT H, GOSENS T, BONGERS CM. Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord. *J Comp Neurol.*, 376: 631-652, 1996.
- HOVI T, SMYTH JF, ALLISON AC, WILLIAMS SC. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol.*, 23:395-403, 1976.
- HUNSKAAR S, FASMER OB, HOLE K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 69-76, 1985.
- JIA H, XIE YF, XIAO DQ, TANG JS. Involvement of GABAergic modulation of the nucleus submedius (Sm) morphine-induced antinociception. *Pain*, 108:28-35, 2004.
- JULIUS D, BASBAUM AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 403: 203-210, 2001.
- KEAY KA, FEIL K, GORDON BD, HERBERT H, BANDLER R. Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: an anterograde and retrograde tracing study. *J Comp Neurol.*, 385:207-29, 1997.

- KHAKH BS, HUMPHREY PPA, HENDERSON G. ATP-gated cation channels P2X (purinoceptors) in trigeminal mesencephalic nucleus neurones of the rat. *J. Physiol.*, 498: 709 - 715, 1997.
- KOPPERT W, WEHRFRITZ A, KORBER N, SITTL R, ALBRECHT S, SCHUTTLER J, SCHMELZ M. The cyclooxygenase isozyme inhibitors parecoxib and paracetamol reduce central hyperalgesia in humans. *Pain.*; 108: 148-53, 2004.
- KOSTER R, ANDERSON M, DEBEER EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, 18: 412, 1959.
- LAMOTTE RH, SIMONE DA, NGEOW JYF, WHITE-HOUSE J, BECERRA-CABAL L, PUTTERMAN GJ. The magnitude and duration of itch produced by intracutaneous injections of histamine. *Somatosens. Res.* 5: 81-92, 1987.
- LEVINE JD, LAM D, TAIWO YO. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38: 5331-5334, 1986.
- LEVY D, ZOCHODNE DW. NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.*, 4: 11-18, 2004.
- LOESER JD, MELZACK R. Pain: an overview. *The Lancet*, 353: 1607-1609, 1999.
- LOESER JD. The prevention of needless pain: Research opportunities. *Prev. Med.*, 23: 709-711, 1994.
- LOH HH, SMITH AP. Molecular characterization of opioid receptor. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30: 123-147, 1989.
- LORENZI H. Árvores Brasileiras. 1 ed., *Editores Plantarum*, 8-25, 1992.
- MALE. Migração celular e inflamação. In: *Imunologia*, Roitt, Brostoff e Male, 5ª ed., Ed. Manole, 1999.

- MAN S, BARAGAR P. Local skin sensory changes after acupuncture. *Can. Med. Assoc. Jour.*, 109: 609-10, 1973.
- MARCEAU F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30:1-26, 1995.
- MAYER D, PRICE D, BARBER J, RAFIL A. Acupuncture analgesia. Evidence for activation of a pain inhibitory system as a mechanism of action. *Adv. Pain Res. Ther.*, 1: 751-754, 1976.
- McGUIRK SM, DOLPHIN AC. G-protein mediation in nociceptive signal transduction: An investigation into the excitatory action of bradykinin in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, 49: 117-128, 1992.
- MEDEIROS AI, SA-NUNES A, SOARES EG, PERES CM, SILVA CL, FACCIOLI LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun*, 72: 1637-1644, 2004.
- MELZACK R, WALL PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150: 971-979, 1965.
- MILLAN MJ. Multiple opioid systems and pain. *Pain.*, 27: 303-347, 1986.
- MILLAN MJ. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Semin. Neurosci.*, 7: 409-419, 1995.
- MILLAN MJ. Alpha 2-adrenergic mechanisms of analgesia: strategies for improving their therapeutic window and identification of the novel, potent alpha 2A-adrenergic receptor agonist, S 18616. *Adv Pharmacol.*, 42: 575-9, 1998.
- MILLAN MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.
- MING LC. Introdução ao estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. Curitiba: SOB informa, 1994.

- MONCADA S, FERREIRA SH, VANE JR. Pain and inflammation mediators. In: VANE JR, FERREIRA SH. Inflammation. Berlim: Springer Verlag Heidelberg, 588-616, 1978.
- NUNES MM. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotacea. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, 83p, 2004.
- OLIVEIRA LF. Dor: fisiopatologia. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 28: 227-288, 1979.
- OSSIPOV MH, LOPEZ Y, BIAN D, NICHOLS ML, PORRECA F. Synergistic antinociceptive interactions of morphine and clonidine in rats with nerve-ligation injury. *Anesthesiology*, 86:196-204, 1997.
- PENG YB, LIN Q, WILLIS WD. Effects of GABA and glycine receptor antagonists on the activity and PAG-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Res.*, 14; 736:189-201, 1996.
- PENNINGTON TD. Sapotaceae: *Flora Neotropica*. Monografia 52: 1-770,1990.
- PERKINS M, DRAY A. Novel pharmacological strategies for analgesia. *Ann Rheum Dis.*, 55: 15-22, 1996.
- PIERCE PA, XIE G-X, MEUSER T, PEROUTKA SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience*, 81: 813-819, 1997.
- RANG HP, BEVAN S, DRAY A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br. Med. Bull.*, 47: 534-548, 1991.
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM. Farmacologia. 5ª ed. *Elsevier*, p. 488, 2003.
- REEH PW, KOCHER L, JUNG S. Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of unmyelinated nociceptors in the rat? *Brain Res.*, 384: 42-50, 1986.

- REEH PW, BAYER J, KOCHER L, HANDWERKER HO. Sensitization of nociceptive cutaneous nerve fibers from the rat's tail by noxious mechanical stimulation. *Exp Brain Res.*, 65: 505-512, 1987.
- REEH PW, KRESS M. Effects of classical algogens. *Semin. Neurosci.*, 7: 221-226, 1995.
- RESTA R, THOMPSON LF. SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol Today*, 18:371-4, 1997.
- REVILLA J. Plantas medicinais da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 2ª ed. *INPA e SEBRAE*, 2001.
- ROBBINS RA, GRISHAM MB. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol*, 29:857-60, 1997.
- ROBBINS SL. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed, *Ed. Guanabara Koogan*, 2000.
- ROBERTSON SJ, RAE MG, ROWAN EG, KENNEDY C. Characterization of a P2X-purinoceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol.*, 118: 951-956, 1996.
- RODRIGUES LEA, DA CRUZ FILHO AAS, PEREIRA E SILVA J, ÁVILA MON, DE ARAÚJO FLV. Simple Method for the assay of Adenosine Deaminase (ADA) activity used for the rapid diagnosis of Tuberculosis. *Bra Arch of Biol and Tec.*, 37: 385-389, 1994.
- RONDÉ P, NICHOLS RA. 5-HT₃ receptors induce rises in cytosolic and nuclear calcium in NG108-15 cells via calcium- induced calcium release. *Cell Calcium*, 22: 265-357, 1997.
- SAMUELSSON B, DAHLEN SE, LINDGREN JA ROUZER CA SERHAN CN. Leukotrienes and lipoxins: structure, biosynthesis and biological effects. *Science*, 237: 1171-1176, 1987.

- SAWYNOK J, REID A. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic P2x receptor. *Eur. J. Pharmac.*, 330: 115-121, 1997.
- SCHIM JD, STANG P. Overview of Pain Management. *Pain Pract.*, 4: 4-18, 2004.
- SHIBATA M, OHKUBO T, TAKAHASHI H, INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38: 347-352, 1989.
- SIMONE DA, KAJANDER KC. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol.*, 77: 2049-60, 1997.
- SORA I, TAKAHASHI N, FUNADZ M, UJIKE H, REVAY RS, DONOVAN DM, MINER LL, UHL GR. Opioid receptor knockout mice define (opioid roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *PNAS*, 94: 1544-1549, 1997.
- SVICHAR N, SHMIGOL A, VERKHRATSKY A, KOSTYUK P. InsP3-induced Ca²⁺ release in dorsal root ganglion neurones. *Neurosci. Lett.*, 227:107-110, 1997.
- TANI E, SHIOSAKA S, SATO M, ISHIKAWA T, TOHYAMA M. Histamine acts directly on calcitonin gene-related peptide- and substance P-containing trigeminal ganglion neurons as assessed by calcium influx and immunocytochemistry. *Neurosci Lett.*, 115: 171-176, 1990.
- TAO X, MA L, LIPSKY PE. Suppression of carrageenan – induced inflammation in vivo by extract of Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Inflamm res.*, 48: 139-148, 1999.
- THORNE P, HOUSLEY G. Purinergic signaling in sensory systems. *Semin. Neurosci.*, 8: 233-246, 1996.
- TJOLSEN A, BERGE O, HUNSKAAR S, ROSLAND JH, HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51: 5-17, 1992.

- VANDER WENDE C, MARGOLIN S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. *Fed. Proc.*, 15: 494, 1956.
- VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38: 97-120, 1998.
- VANE JR, BOTTING RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.*, 104: 2S-8S, 1998.
- VAZ ZR, CECHINEL FILHO V, YUNES RA, CALIXTO JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *JPET*, 278: 304-312, 1996.
- VIERCK CJ Jr, CANNON RL, FRY G, MAIXNER W, WHITSEL BL. Characteristics of temporal summation of second pain sensations elicited by brief contact of glabrous skin by a preheated thermode. *J Neurophysiol.*, 78: 992-1002, 1997.
- WAGNER R, JANJIGIAN M, MYERS RR. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain*, 74: 35-42, 1998.
- WILLINGALE HL, GARDINER NJ, McLYMONT N, GIBLENT S, GRUBB BD. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol.*, 122:1593-604, 1997.
- WILLIS WD Jr. The pain system: The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. *Pain Head.*; 8: 1-346, 1985.
- WILLIS WD, COGGESHALL RE. Sensory mechanisms of the spinal cord. 2^a ed. Plenum press, p. 595, 1991.
- WOOLF CJ, DOUBELL TP. The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 4: 525-534, 1994.

WOOLF CJ, SAFIEH-GARABEDIAN B, MA QP, CRILLY P, WINTER J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*, 62: 327-31, 1994.

ZHANG L, PEOPLES RW, OZ M, HARVEY-WHITE J, WEIGHT FF, BRAUNEIS U. Potentiation of NMDA receptor-mediated responses by dynorphin at low extracellular glycine concentrations. *J Neurophysiol.* 78: 582-590, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)