

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

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ASTILBINA, E DA XANTOXILINA E
SEUS DERIVADOS**

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

**ZULMA RAQUEL VAZ
Florianópolis
1996**

Vaz, Zulma Raquel. *Efeito antinociceptivo da astilbina, e da xantoxilina e seus derivados*. Florianópolis, 1996. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 15/02/96

Estudo do efeito [antinociceptivo] da [astilbina, e da xantoxilina e seus derivados], em vários modelos de [nocicepção] em [camundongos]. Os derivados da astilbina e xantoxilina causaram efeito analgésico nos testes de dor induzido pela injeção de [ácido acético] e [formalina]. O derivado da xantoxilina denominado [composto C11] foi o mais ativo dos compostos estudados. Os experimentos realizados para estudar os possíveis mecanismos de ação do [composto C11] revelaram que seus efeitos antinociceptivos não parecem envolver o [sistema opióide], a [via L-arginina-óxido-nítrico], a interação com os sistemas [adrenérgico], e [Gabaérgico] ou modulados pelos [hormônios produzidos pelas glândulas adrenais]. Porém, suas propriedades analgésicas dependem, pelo menos em parte, do sistema [serotoninérgico].

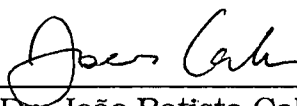
[testes tail-flick, placa quente, rota-rod].

**"EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ASTILBINA, XANTOXILINA E SEUS
DERIVADOS"**

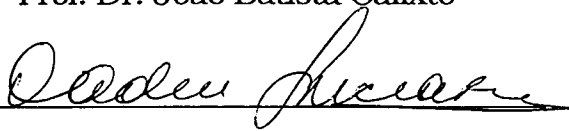
POR

ZULMA RAQUEL VAZ

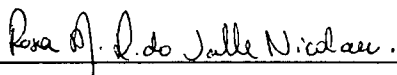
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof. Dr. João Batista Calixto



Profa. Dra. Caden Souccar



Profa Dra Rosa M.Ribeiro do Valle Nicolau

Florianópolis, fevereiro de 1996.

O crédito pertence aquele que lutou com denodo; que não desistiu nunca; que sente grande entusiasmo e grande empenho; que se devota a boa causa; e que, no melhor dos casos, obtém ao fim o triunfo da grande realização; e que, no pior, quando fracassa, ao menos fracassa ousando galhardamente. Assim, o seu lugar nunca será entre aquelas almas tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota.

Theodore Roosevelt

Este trabalho é dedicado especialmente a Rogério Schmidt, que sempre esteve ao meu lado incentivando e ao mesmo tempo compreendendo todas as etapas do meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Neide Boell Vaz e Ivan de Senna Vaz, pela dedicação e oportunidade de alcançar todos os objetivos traçados na minha vida e aos meus irmãos Robertô, Sandra, Elisa e Ivan.

Ao Professor Doutor João Batista Calixto, pelo incentivo e empenho durante todo o curso e no presente trabalho.

Ao Professor Doutor Valdir Cechinel Filho, pela participação durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento, em especial à Maria Conceição Rosa Ataíde, Patrícia Vianna de Abreu e Josane Andrada.

Aos colegas de laboratório, Ana Paula, Adenir, Alessandra, Eduardo, Elza, Karla, Luciano, Marcos, Rafael, Ricardo, Rose e Tânia em especial à Rosana Ostrosky.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial à Daniela de Almeida Cabrine, Niraldo Paulino e Mariem El Sayad pela colaboração e companheirismo.

Aos amigos Adair Roberto Soares Santos e Maria Martha Campos, que estiveram sempre ao meu lado como “verdadeiros amigos”.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos os espíritos de luz que me iluminam no dia a dia.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| Animais..... | 18 |
| A - Análise química..... | 18 |
| B - Análise farmacológica..... | 20 |
| 1 - Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético..... | 20 |
| 2 - Dor induzida pela formalina em camundongos..... | 21 |
| 3 - Dor induzida pela capsaicina em camundongos..... | 24 |
| 4 - Teste do tail-flick em camundongos..... | 26 |
| 5 - Teste da placa quente em camundongos..... | 27 |
| 6 - Efeito sobre a performance motora (rota-rod) em camundongos..... | 28 |
| 7 - Modelo da pressão na pata em ratos (Randall-Selitto)..... | 29 |

| | |
|--|----|
| C - Estudo do possível mecanismo de ação analgésica do composto C11..... | 29 |
| 1 - Possível participação da via do óxido nítrico na ação antinociceptiva do composto C11 no modelo das contorções abdominais e na dor induzida pela formalina | 29 |
| 2 - Possível participação do ácido gama-aminobutírico (GABA) na ação antinociceptiva do composto C11 no modelo das contorções abdominais | 30 |
| 3 - Possível participação dos opióides na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina | 31 |
| 4 - Possível participação do sistema adrenérgico na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina | 31 |
| 5 - Possível participação do sistema serotoninérgico na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina | 32 |
| 6 - Possível participação dos glicorticóides endógenos na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina | 33 |
| Drogas e soluções usadas | 34 |
| Análise estatística | 35 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 36 |
| Dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético | 36 |
| Dor induzida pela formalina..... | 43 |
| Dor induzida pela capsaicina | 52 |
| Efeito do composto C11 na hiperalgesia no teste da pressão na pata (Randall-Selitto) | 52 |
| Efeito do composto C11 nos testes de tail-flick e placa quente..... | 54 |
| Efeito do composto C11 no teste do rota-rod | 55 |
| Efeito do possível mecanismo de ação antinociceptivo do composto C11 | 55 |
| Efeito do tratamento com o composto C11 no modelo das contorções abdominais | 55 |
| Efeito do tratamento com o composto C11 no modelo da formalina | 57 |
| | |
| DISCUSSÃO | 64 |
| SUMMARY | 78 |
| RESUMO | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estrutura molecular dos compostos estudados 19
- FIGURA 2 - Efeito analgésico causado pela astilbina e seus derivados C1 e C3 sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 37
- FIGURA 3 - Efeito analgésico causado pela xantoxilina e seus compostos C4 e C7 sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 38
- FIGURA 4 - Efeito analgésico causado pelos compostos C8, C9 e C10 sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético..... 39
- FIGURA 5 - Efeito analgésico causado pelos compostos C11 e C12 sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 41
- FIGURA 6 - Efeito analgésico causado pela aspirina e o acetaminofeno sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético..... 42

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 7 - Efeito analgésico causado pelo composto C11, aspirina e acetaminofeno na dor induzida pela formalina | 46 |
| FIGURA 8 - Efeito analgésico causado pela injeção subcutanea do composto C11 e morfina na dor induzida pela formalina | 48 |
| FIGURA 9 - Efeito analgésico causado pela injeção subplantar do composto C11 na dor induzida pela formalina | 49 |
| FIGURA 10 - Efeito analgésico causado pela injeção intracerebroventricular do composto C11 e morfina na dor induzida pela formalina | 50 |
| FIGURA 11 - Efeito analgésico causado pela injeção intratecal do composto C11 e morfina na dor induzida pela formalina | 51 |
| FIGURA 12 - Efeito analgésico do composto C11 e da morfina administrado na dor induzida pela capsaicina | 53 |

FIGURA 13 - Influência do pré-tratamento de camundongos com faclofen sobre a atividade analgésica causada pelo baclofen ou composto C11 em relação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 56

FIGURA 14 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a atividade analgésica causada pelo composto C11 ou da morfina em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina 58

FIGURA 15 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosin sobre a atividade analgésica causada pela fenilefrina ou composto C11 em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina 59

FIGURA 16 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina sobre a atividade analgésica causada pelo L-NOARG, composto C11 ou morfina em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina ou sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 61

FIGURA 17 - Influência do pré-tratamento em camundongos com DL-p-clorofenilalanina metil ester sobre a atividade analgésica causada pela morfina ou composto C11 em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina 62

INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência universal da espécie humana. Todos sabem o que significa, mas não existe uma definição satisfatória de dor. A maior parte dos neurônios envolvidos no processamento da informação dolorosa pertence a áreas como as paredes mediais e caudais dos ventrículos, o tálamo, o hipotálamo e a substância ativadora reticular ascendente do tronco cerebral. A participação destas áreas, sob o ponto de vista evolutivo, no controle ou na inibição da nocicepção, sugere que estas propriedades são comuns a muitas espécies animais, o que permite estudar as propriedades fisiológicas deste sistema em várias espécies (Brandão, 1991).

A dor envolve vários processos fisiológicos e farmacológicos, tais como os receptores, as vias de transmissão e modulação, além de diferentes substâncias que estão direta ou indiretamente envolvidas nos processos dolorosos. O termo “nociceptor” é uma abreviação de nociceptor (Sherrington, 1906; Melzack e Wall, 1983). Em geral, os nociceptores estão localizados em várias partes do corpo e representam ramos terminais especializados das fibras nervosas sensoriais. O calor, o frio, a pressão, a distensão e os estímulos químicos, podem, direta ou indiretamente ativar os nociceptores (Lico, 1979; Bessou e Perl, 1969; Handwerker e Reeli, 1994). A ativação dos nociceptores pode ocorrer através da liberação de

substâncias endógenas como, por exemplo, a bradicinina, a substância P (SP), a serotonina, a histamina, as prostaglandinas, os leucotrienos etc., ou também por íons, produzindo a sensação de dor (Melzack e Wall, 1983; Benedetti e Butler, 1990; Bonica, 1990).

Os receptores nociceptivos transmitem os impulsos nervosos para a medula espinhal através de três tipos distintos de fibras nervosas: as fibras A β , que são mielinizadas e de grande diâmetro, sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso; as fibras A δ normalmente pequenas e mielinizadas (Georgopoulos, 1976, 1977) e finalmente as fibras C, pequenas e não mielinizadas, são responsáveis pela condução lenta do estímulo doloroso (Adriaensen et al., 1983; Raja et al., 1988; Cohen e Perl, 1990;).

O estímulo doloroso é transmitido através das fibras nervosas especializadas até o corno dorsal da medula espinhal. Esse estímulo faz com que células localizadas no corno dorsal e na substância gelatinosa da medula espinhal liberem mediadores químicos diretamente envolvidos na transmissão do impulso doloroso, entre eles destacam-se alguns neuropeptídeos (como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)), os aminoácidos excitatórios, e mediadores que inibem a transmissão nociceptiva tais como os opióides endógenos, serotonina e a noradrenalina, entre outros (Dickenson, 1995). Melzack e Wall

(1965) propuseram o modelo do controle de comporta na percepção da dor, que continua sendo revisto até os dias de hoje. Nesse modelo é proposto que as fibras finas estimulam a liberação de substâncias que potencializam a transmissão da dor (abrindo a comporta) e que as fibras grossas produzem liberação de outro tipo de substâncias que modulam a transmissão nociceptiva (fechando a comporta). As substâncias transmissoras podem ser influenciadas por impulsos nociceptivos provenientes da periferia que podem ser regulados pela substância gelatinosa ou projeções descendentes do corno dorsal medular, o qual constitui um sistema de feedback negativo ativado pela estimulação espinoreticular, espinotalâmica e espinocortical, inibindo a transmissão nociceptiva espinhal.

Segundo Dray (1995), alguns fatores são associados com a inflamação junto à estimulação da fibras nervosas periféricas na indução da dor; como mudanças no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, ativação e migração de células imune, além de mudanças na liberação de fatores tróficos e de crescimento próximos dos tecidos. Eles podem produzir várias e complexas alterações nas fibras aferentes em consequência da ativação ou sensibilização por outros estímulos, pelas alterações no fenótipo e estrutura do nervo sensorial.

Alguns mediadores podem atuar em nível das proteínas da membrana e dos canais iônicos modificando a permeabilidade e a excitabilidade celular, sendo que essas interações atuam via ativação de receptores de membrana, que são geral, mas

não exclusivamente, acoplados a proteínas sinalizadoras (proteína G), que ativam outras proteínas (segundo-mensageiro) causando o efeito biológico (Gudermann et al, 1995). Sua estimulação pode resultar em mudanças das atividades de proteínas quinases específicas que são responsáveis pela fosforilação de proteínas intracelulares, causando assim mudanças na conformação do canal iônico da membrana ou pela ativação e/ou inibição de enzimas celulares como, por exemplo, as respostas acopladas aos receptores de adenosina, bradicinina, serotonina e prostanóides, entre outros

Uma variedade de substâncias são liberadas pelas células após lesão tecidual, enquanto que outras são sintetizadas durante os eventos após a injúria. Entre elas destacam-se os radicais livres (as espécies de oxigênio reativo) que têm recebido atenção com respeito a ativação de fibras aferentes durante a injúria tecidual. Os radicais livres, incluindo os superperóxidos e peróxidos de hidrogênio e também algumas espécies de hidroxil, são produtos gerados pela transferência elétrica celular e são importantes para a regulação de inúmeras atividades na transcrição do gen. A produção de espécies livres reativos de oxigênios são importantes na inflamação, evidenciada pela ativação de nociceptores. No entanto, tem sido proposto que os peróxidos de hidrogênios potencializam outros mediadores pró-inflamatórios incluindo a bradicinina, as prostaglandinas E₂ (PGE₂) e o peptídeo vasodilatador relacionados ao gene de calcitonina (CGRP) (Wey et al., 1992).

O óxido nítrico vem sendo descrito como uma molécula importante nos processos envolvidos na nocicepção. A via mais importante de formação do óxido nítrico é através da L-arginina (Moncada et al., 1991). Esse processo ocorre em muitos tipos de células, em particular, em neurônios sensoriais de tamanho pequeno e médio (Verge et al., 1992), sob a ativação da enzima óxido nítrico sintase, na presença de cálcio e outros cofatores, levando à formação de NO e liberação de citrulina. Tem sido demonstrado também que o óxido nítrico formado altera os processos celulares, principalmente via ativação da guanilato-ciclase, promovendo em consequência o aumento da produção de GMPc gerado a partir do GTP. Quando ocorre uma inflamação crônica ou na injúria do tecido, ocorre aumento de uma nova forma de óxido nítrico sintase, que atua independente da presença de cálcio, chamada de NO-sintase-induzida, que para a sua ação depende da síntese protéica e está associada a processos inflamatórios, como por exemplo nos processos inflamatórios crônicos (Verge et al, 1992; Salvemini et al., 1993).

Outras substâncias envolvidas no processo da dor inflamatória são os prótons, que provavelmente estão envolvidos na hiperalgesia e na sensação de desconforto da dor muscular (Bevan e Geppetti, 1994; Dray, 1994). A administração exógena de soluções ácidas produz um rápido, mas transitório, aumento da permeabilidade de cátions na membrana dos neurônios sensoriais, causando dessa forma aumento na sensibilidade ao estímulo mecânico. Existem evidências sugerindo que esse efeito é

semelhante àquele induzido pela capsaicina, cuja a ação é altamente específica em nível dos nociceptores polimodais (Bevan e Yeats, 1991; Dray, 1992).

As cininas constituem um importante grupo de substâncias envolvidas na dor e na inflamação, conhecidas por exercer inúmeros efeitos pró-inflamatórios diretos ou indiretos, causando a liberação de prostanóides, citocinas ou radicais livres em uma grande variedade de células. As cininas também estimulam neurônios simpáticos pós-ganglionares liberando neuropeptídeos (Hall e Geppetti, 1995), e também podem degranular mastócitos liberando histamina e outros mediadores inflamatórios. As cininas são potentes substâncias algogênicas e induzem a dor pela estimulação dos receptores B_2 localizados na pele, juntas e músculos, ou pela sensibilização através do estímulo mecânico e térmico (Beck e Handwerker, 1974; Rang et al., 1994). Contudo, durante a inflamação prolongada, ocorre a síntese e expressão do receptor B_1 , que pesquisas recentes indicam sua participação significativa no estabelecimento da hiperalgesia (Dray e Perkins, 1993). Outros mediadores envolvidos na inflamação, como as citocinas, entre elas algumas interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa também induzem hiperalgesia pela facilitação e indução dos receptores B_1 , pela estimulação da produção dos prostanóides e /ou pela ativação dos neurônios simpáticos, sendo esse efeito inibido pela indometacina, antagonista da interleucina-1, pela simpatectomia ou pelos antagonistas dos adrenoceptores (Ferreira et al., 1994).

Existem outras substâncias diretamente envolvidas na gênese da dor de origem neurogênica e inflamatória, como os derivados do metabolismo do ácido araquidônico, entre eles as prostaglandinas, leucotrienos e ácidos hidroxil, que são os mediadores mais importantes dos processos inflamatórios, cuja síntese depende das atividades das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase. As prostaglandinas são responsáveis pela excitabilidade dos nociceptores, ou seja, são as principais causadoras da redução do limiar de dor (sensibilização), contribuindo assim para o estabelecimento da hiperalgisia. As prostaglandinas são geralmente geradas por uma forma constitutiva da enzima, a cicloxigenase (COX-1) apresentam inúmeras funções fisiológicas (Mitchell et al, 1993; Coleman et al,1994). Mais recentemente, outra forma de cicloxigenase (COX-2) tem sido descrita durante o processo inflamatório, sendo que ambas as cicloxigenases são sensíveis às drogas antiinflamatórias não esteróidais (Mitchell et al, 1993). Entretanto, algumas dessas drogas são mais efetivas em relação a uma ou outra forma das enzimas (Vane, 1994; Isakson et al.,1995).

Dray e et al., (1995), demonstraram que a adenosina trifosfato (ATP) é capaz de estimular os neurônios sensoriais e causar aumento da permeabilidade aos cátions, justificando dessa maneira a dor aguda e transitória que é observada quando o ATP é administrado por via intradérmica. A adenosina também provoca dor e hiperalgisia, sendo esse efeito mediado pela ativação dos receptores A₂ da

adenosina. Esses receptores estão acoplados à adenilato ciclase e, quando estimulados, determinam um aumento da produção do AMPc, com consequente redução da permeabilidade dos íons potássio, colaborando assim para a hiperexcitabilidade nas fibras aferentes nociceptivas. Por outro lado, a adenosina também pode ativar os receptores A1 que induzem diminuição dos níveis de AMPc. Esse efeito pode resultar em redução da excitabilidade aferente pelo bloqueio da condutância ao cálcio ou aumento da permeabilidade ao potássio, dessa forma, modulando a transmissão nociceptiva (Bleehan e Keele, 1977; Levine et al., 1993; Rang et al., 1994).

A serotonina é uma amina endógena que pode causar excitação direta dos neurônios sensoriais pelo aumento da permeabilidade ao sódio via ativação de receptor do tipo 5HT-3. Além disso, foi também proposto que a serotonina induz sensibilização dos neurônios nociceptivos via ativação dos receptores 5HT-1 e 5HT-2 (Levine et al., 1993). Assim, a serotonina causa diminuição da permeabilidade aos íons potássio com consequente despolarização da membrana, fatores que podem resultar na redução do limiar excitatório dos neurônios para o estímulo térmico e de pressão (Beck e Handwerker, 1974; Dray, 1994).

A histamina é um dos mediadores pró-inflamatórios mais conhecidos, liberada pela degranulação de mastócitos causada por vários agentes mecânicos e inúmeros mediadores inflamatórios como SP, IL-1 e fator de crescimento neural. A

histamina pode atuar nos neurônios sensoriais produzindo irritação em baixas concentrações e dor em altas concentrações (Dray et al., 1994). A ativação dos receptores H_1 pela histamina a nível dos neurônios sensoriais pode resultar em aumento da permeabilidade ao cálcio provocando, assim, liberação de neuropeptídeos sensoriais além de prostaglandinas e ácidos mono-hidróxidos eicosatetraenóicos pelas células endoteliais, levando à hiperalgesia e a outros efeitos pró-inflamatórios. (Rang et al., 1994).

Nos últimos anos o interesse por novas substâncias com atividade analgésica e/ou antiinflamatórias, utilizadas principalmente para o controle da dor e da inflamação de origem neurogênica, vem aumentando consideravelmente, quer pelo aparecimento de um grande número de substâncias químicas endógenas (principalmente neuropeptídeos) que estão envolvidas nesses processos, bem como pelo envolvimento desses mediadores com outras patologias (Coderre et al, 1993; Seguin et al., 1995). Várias evidências indicam que os neuropeptídeos estão presentes nos neurônios do sistema nervoso periférico e do sistema nervoso central, onde exercem papel relevante como neurotransmissores e/ou neuromoduladores. Atualmente, os estudos parecem confirmar não só essa previsão, mas também o papel exercido por peptídeos em diversas funções fisiológicas e patológicas (Hökfelt *et al.*, 1987; Myers, 1994). Os neuropeptídeos, em particular a substância P (SP) e outras neurocininas, têm sido propostos como neurotransmissores e/ou moduladores na

transmissão da informação nociceptiva principalmente em nível da medula espinhal (Otsuka e Yoshioka, 1993).

As neurocininas encontradas no sistema nervoso central de mamíferos são: a SP, neurocinina A (NKA, substância K, neuromedina ou neurocinina), neurocinina B (NKB, neuromedina K) (Kanawaga *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 1983; Maggio *et al.*, 1983, Shimada *et al.*, 1987), neurocinina K (neuropeptídeo K) e a neurocinina G (neuropeptídeo G) (Tatemoto *et al.*, 1985; Kage *et al.*, 1988). As neurocininas são armazenadas em grandes vesículas sinápticas localizadas na região terminal do axônio (Maggi *et al.*, 1993). A liberação do conteúdo dessas vesículas para a fenda sináptica ocorre por: 1) estímulos externos como pela capsaicina, potássio ou outros agentes capazes de induzir despolarização neuronal, ou 2) em condições fisiopatológicas, podendo ocorrer durante o peristaltismo intestinal, após estímulos térmicos na pele, por aplicação de estímulos dolorosos e não dolorosos na medula espinhal, ou ainda podem ser liberados durante os processos inflamatórios. Atualmente, existem várias evidências experimentais indicando que as neurocininas estão amplamente distribuídas tanto no sistema nervoso central quanto periféricamente (Helke *et al.*, 1990; Otsuka e Yoshioka, 1993). A nível periférico, as neurocininas são encontradas numa variedade de tecidos, principalmente nos neurônios aferentes primários da raiz do gânglio dorsal sensíveis à capsaicina, que na verdade constitui a fonte neuronal mais comum de neurocininas. A SP frequentemente

coexiste com outras neurocininas no mesmo neurônio, mas também comumente coexiste ou interage intimamente com neurotransmissores clássicos, tais como dopamina (DA), acetilcolina (Ach), opiáceos, serotonina, GABA e aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), todos mediadores envolvidos na nocicepção (Pernow, 1986; Hökfelt *et al.*, 1987; Chang, 1988; Battaglia e Rustioni, 1988; Debiasi e Rukstioni, 1988).

O aumento da excitabilidade central pode ser responsável por algumas mudanças na sensação da dor caracterizada por lesão e/ou inflamação dos tecidos periféricos (Treede *et al.*, 1992). Leah *et al.* (1985) demonstraram que as fibras aferentes tipo C podem ter “receptores silenciosos” para as neurocininas, sendo esses sensibilizados pelo processo inflamatório do tecido periférico (Habler *et al.*, 1990). Essas observações foram confirmadas por Hope *et al.* (1990), que demonstraram que a SP e a NKA têm seus níveis aumentados nos gânglios dorsais da medula de gato após a aplicação de estímulo mecânico (Schaible *et al.*, 1990).

Considerável esforço nos últimos anos tem sido empregado com objetivo de compreender os mecanismos responsáveis pela hiperalgesia, que está relacionada com uma complexa modulação do sistema nociceptivo (Beitel e Dubner, 1976; Perl *et al.*, 1974). Contudo, a hiperalgesia frequentemente estende-se não só próximo ao sítio lesionado, mas também para partes remotas do organismo (Woolf, 1984;Coderre e Melzack, 1985). Tais resultados sugerem que a sensibilização central pode

desempenhar importante papel na sensação dolorosa (Hardy *et al.*, 1950). Os aminoácidos excitatórios e a SP, assim como seus receptores presentes nos gânglios dorsais da medula espinhal, parecem desempenhar um importante papel no processo de sensibilização. Assim, a estimulação das fibras aferentes primárias causa liberação de aminoácidos excitatórios e SP na medula espinhal (Go e Yaksh, 1987; Skilling *et al.*, 1988; Sorkin *et al.*, 1992). A administração espinhal de antagonistas de receptores para a SP (receptor NK₁) e de aminoácidos excitatórios (receptor de NMDA e de AMPA), é capaz de bloquear a facilitação da resposta nociceptiva produzida por estimulação nociceptiva das fibras C aferentes (Coderre e Melzack, 1992; Dickenson e Sullivan, 1987a; Malmberg e Yaksh, 1992ab; Yamamoto e Yaksh, 1992ab). Entretanto, a aplicação espinhal de SP, AMPA e NMDA produziu hiperalgesia prolongada (Aonansen e Wilcox, 1986; Malmberg e Yaksh, 1992), sendo que as ações da SP e dos agonistas de receptores NMDA foram acompanhadas por aumento dos níveis de prostanóides e de óxido nítrico (Malmberg e Yaksh, 1992ab,1993; Meller *et al.*, 1992). A SP e os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), atuando em seus receptores específicos, determinam aumento dos níveis de cálcio intracelular, que em consequência ativa vários segundos-mensageiros importantes no estabelecimento do processo de hiperalgesia. O aumento do influxo de cálcio causado pela estimulação dos receptores de NMDA (MacDermott *et al.*, 1986) ou da SP (Womack *et al.*, 1989), ativa a óxido nítrico sintase facilitando assim a geração do

óxido nítrico através da L-arginina (Garthwaite *et al.*, 1988). O óxido nítrico formado, por sua vez, vai causar a ativação da guanilato ciclase solúvel e com consequente aumento dos níveis de GMPc (Southan *et al.*, 1991). Além disso, o óxido nítrico ativa a fosfolipase A₂ neuronal, e a produção do ácido araquidônico (Dumuis *et al.*, 1990), que será metabolizado em vários eicosanóides (Gammon *et al.*, 1989) importantes na gênese da dor.

Jancsó *et al.* (1967) demonstraram que a capsaicina, um produto pungente extraído da pimenta vermelha (planta do gênero Capsium), quando aplicada na pele ou injetada em ratos adultos induz reação dolorosa inicial com subsequente dessensibilização da dor induzida quimicamente. É também conhecido que a capsaicina despolariza os corpos celulares dos neurônios sensoriais aferentes tipo “C” do gânglio dorsal da medula e seus axônios “in vitro”, sendo esse efeito, em parte, decorrente da liberação de diversos neuropeptídeos (Kessler *et al.*, 1983; Williams e Zieglansberger, 1987). Szolcsanyi e Jacso-Gabor (1975) sugeriram o primeiro modelo de receptor para a capsaicina. Após duas décadas, o receptor foi caracterizado e denominado de receptor vanilóide (Szallasi e Blumberg, 1990b). Atualmente, além da capsaicina, uma outra substância atua em receptores vanilóides, o diterpeno resiniferotoxina, que foi isolada de um tipo de cactos do Marrocos (Euforbia resinifera). A resiniferotoxina possui estrutura diferente do grupo de substâncias capsaicinóides, mas tem o grupo homovanilóide que é essencial para

conferir a atividade nesses receptores. A resiniferotoxina apresenta atividade bem superior àquela mostrada pela capsaicina. Nos terminais dos neurônios aferentes a capsaicina induz liberação de SP imunorreativa (Gamse *et al.*, 1979, 1981; Helke *et al.*, 1990), e também libera SP da medula espinhal de gato “*in vitro*” (Yaksh *et al.*, 1980), produzindo dessensibilização dos neurônios aferentes primários (Lembeck, 1988; Szolcsanyi, 1985), além de liberar vários peptídeos pró-inflamatórios dos tecidos periféricos, incluindo a SP, NKA, CGRP, NKB entre outros. Recentemente, foi descrito um antagonista competitivo e seletivo para a capsaicina, chamado de capsazepina (Urban e Dray, 1991; Bevan *et al.*, 1992; Walpole e Wrigglesworth, 1993).

Jancsó *et al.* (1967) foram os primeiros pesquisadores a utilizarem o termo “inflamação neurogênica” para descrever os eventos mediados pelos vários neuropeptídeos, caracterizados por aumento da permeabilidade vascular, extravazamento plasmático, e eritema que ocorre na pele quando os nervos sensoriais são estimulados por administração tópica de irritantes, como a capsaicina, salina hipertônica, formaldeído e a estimulação elétrica antidrômica. Vários desses efeitos são também observados nas vias aéreas, tanto de animais como de humanos, após a estimulação com as diferentes neurocininas. Entre outros efeitos, as neurocininas liberadas causam a contração da musculatura lisa, estimulam secreção das glândulas submucosas, produzem vasodilatação e aumento da permeabilidade

vascular (Lundberg e Saria, 1987; Barnes *et al.*, 1991 a, b), efeitos esses típicos da inflamação neurogênica. Além disso, os neuropeptídeos pró-inflamatórios possuem importantes efeitos desde a estimulação da proliferação dos linfócitos T, estimulação de macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Payan, 1992; Numao e Agrawal, 1992; Smith *et al.*, 1993). Em razão dos inúmeros efeitos descritos para os neuropeptídeos sensoriais, eles estão geralmente implicados em várias patologias, incluindo as desordens das vias aéreas, como a rinite e a asma, entre outros (Baranuik e Kaliner, 1990; Solway e Leff, 1991; Joos *et al.*, 1994), além de estarem intimamente relacionados com os processos nociceptivos e inflamatórios de origem neurogênica.

Inúmeros compostos naturais têm encontrado emprego no mercado farmacêutico para o tratamento da dor. Nos últimos anos, estudos desenvolvidos no laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, permitiram isolar diversas substâncias derivadas de plantas (Cechinel, 1995). Em estudos anteriores, foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico obtido das cascas da Hymenaea martiana (Leguminosae), planta conhecida como jatobá e usada popularmente como antiinflamatória e antialérgica, foi efetivo em antagonizar as respostas a vários neurotransmissores (bradicinina, angiotensina II, serotonina e prostaglandinas) em preparações isoladas de músculos lisos (Calixto *et al.*, 1988). Além disso, esse extrato também apresentou efeito analgésico importante em vários modelos

experimentais (Calixto et al., 1989; Neves et al., 1993). O fracionamento deste extrato permitiu isolar e identificar três glicosídeos, caracterizados como sendo a eucrifina, a engeletina e a astilbina (Carneiro, 1989). A astilbina foi obtida em altas concentrações (6%).

Outro extrato obtido no laboratório de Química foi o da Sebastiania schottiana (Euphorbiaceae), planta popularmente conhecida como “quebra-pedra”, utilizada pela medicina popular para o tratamento de afecções renais. Seu extrato apresentou atividade antiespasmódica em diversos modelos experimentais “in vitro” (Calixto et al., 1986). O principal constituinte ativo presente no extrato foi posteriormente isolado e identificado como sendo a 2-hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona, também conhecida como xantoxilina, com rendimento de 0,25% (Miguel, 1987; Calixto et al., 1990b).

Recentemente, uma outra abordagem também interessante, utilizada pelo grupo de produtos naturais da Universidade Federal de Santa Catarina, foi tentar obter derivados sintéticos de produtos naturais mais abundantes, na tentativa de produzir compostos semi-sintéticos com maior atividade farmacológica (Cechinel, 1995). Neste trabalho, procurou-se analisar as ações antinociceptivas de alguns derivados da astilbina e xantoxilina, em vários modelos de nocicepção.

OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- 1 - Analisar o possível efeito analgésico da astilbina e xantoxilina, dois produtos naturais abundantes, bem como alguns de seus derivados, nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.
- 2 - Investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas causadas pelo composto C11 (2-(4-bromobenzoil)-3-metil-4,6-dimetoxi benzofuran), derivado da xantoxilina que revelou maior propriedade analgésica, com o emprego de agonistas e antagonistas específicos de vários receptores, bem como inibidores enzimáticos conhecidos, em vários modelos de nocicepção de origem neurogênica e inflamatória.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos suíços (25 - 35 g) e ratos machos Wistar (180 - 220 g) criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram mantidos à temperatura controlada de $22 \pm 24^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso a água e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatizados nos laboratórios durante um período de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, foram realizados geralmente entre 8 h e 17 h.. Cada animal foi usado apenas uma vez.

A - Análise química

Síntese dos compostos

A astilbina (taxifolin) e seus derivados : C1 (diidroxiquercitina 3,3,4,5,7-pentaidroxiflavona), C2 (dihidroxiquercitina penta-acetato), C3 (3',4',5,7-tetrametoxidihidroquercitina) ou a xantoxilina (2-hidróxi-4,6-dimetóxi acetofenona) e seus derivados : C4 (2-hidróxi-3-bromo-4,6 dimetóxi acetofenona), C5 (2-hidróxi-3,5 dibromo-4,6 dimetóxiacetofenona), C6 (5,7-dimetóxi-4,6 cloro-flavona), C7 (2-acetilóxi-3-bromo-4,6-dimetóxiacetofenona), C8 (2-hidróxi-4,6 dimetóxi 3'4'-metileno dioxichalcona), C9 (2-(4-bromobenzilox)4,6-dimetóxiacetofenona), C10 (2,4,6-trimetóxi-3-bromo-acetofenona), C11 (2-(4-bromobenzoil)-3-metil-4,6-

dimetóxi benzofuran) e C12 (2-hidroxi-3-bromo-4,6-dimetóxi-chalcona) (figura 1) foram obtidos e preparados pelo grupo do Professor Rosendo Augusto Yunes no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC.

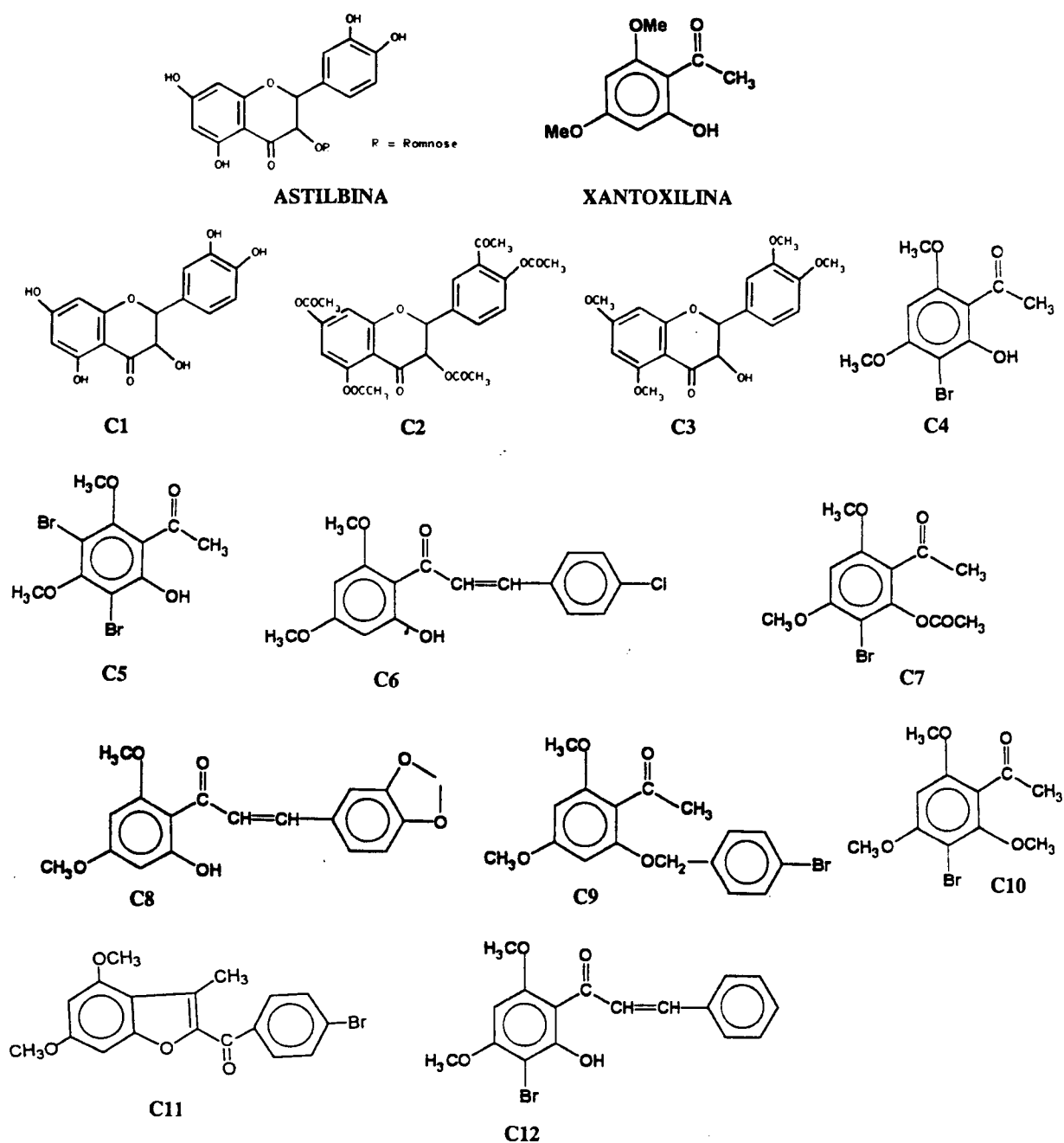


FIGURA 1 - Estrutura molecular dos compostos estudados.

A síntese dos derivados da astilbina ou da xantoxilina foi feita através de métodos convencionais. Todos os compostos foram caracterizados por métodos espectroscópicos. Para mais detalhes sobre os procedimentos usados na síntese desses compostos ver Cechinel- Filho (1995).

B - Análise farmacológica

1 - Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos

Inicialmente foi analisado o possível efeito analgésico bem como a duração do efeito dos compostos no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético que, embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto a nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0.6%, 0,1 ml/10g peso animal), de acordo com o método descrito anteriormente (Bentley *et al.*, 1981; Collier *et al.*, 1968.)

Grupos distintos de animais foram pré-tratados com a astilbina ou com seus derivados C1 a C3 (8,3 - 182,9 $\mu\text{mol/kg}$), ou com a xantoxilina e seus derivados C4 a C12 (0,8 - 549,4 $\mu\text{mol/kg}$) por via intraperitoneal, 30 min antes da injeção de ácido acético. Para efeito de comparação, outros grupos de animais foram tratados com drogas padrão: a aspirina e o acetaminofeno (55,5 - 1984,2 $\mu\text{mol/kg}$) i.p. ou v.o., 30 e 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, respectivamente.

Os animais controle receberam volume similar de solução de NaCl a 0.9% (10 ml/kg, i.p.).

Após a injeção de ácido acético, os animais foram observados em pares, em funis de vidro individuais, sendo que o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com astilbina, xantoxilina ou seus derivados e/ou com as ações da aspirina ou acetaminofeno comparados com o número das contorções abdominais obtidas nos animais controles (tratados com salina).

2 - Dor induzida pela formalina em camundongos

Para analisar a possível ação analgésica dos compostos, em um modelo de dor de origem neurogênica, foi utilizado inicialmente o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, que é um modelo mais específico e permite avaliar duas fases distintas de dor: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de diversos mediadores inflamatórios). O procedimento utilizado foi essencialmente similar àquele descrito anteriormente (Hunskar *et al.*, 1985, 1986; Murray *et al.*, 1988; Corrêa e Calixto, 1993). Os animais foram levemente anestesiados com éter, exceto quanto utilizados para analisar a primeira fase da dor induzida pela formalina.

A seguir, receberam 20 μ l de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) preparada em uma solução de tampão (concentração da solução de PBS; NaCl 137 mM, KCL 2.7 mM e tampão 10 mM), ou salina injetadas intraplantarmente na pata direita e esquerda, respectivamente.

Logo após, os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação, sendo observados por um período de 0 a 30 min. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, foi considerado como indicativo de nocicepção. Esse modelo permite evidenciar duas fases distintas de dor : a primeira fase, 5 min após a injeção de formalina, caracteriza a dor de origem neurogênica, e a segunda fase, 15 a 30 min após a injeção de formalina, representando a resposta tônica normalmente acompanhada de resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (Hunskar e Hole, 1987). Para evitar a influência de fatores farmacocinéticos da ação das drogas estudadas, diferentes grupos de animais foram usados para analisar cada fase do teste de formalina.

Os animais foram pré-tratados com os compostos mais ativos detectados no modelo de contorções abdominais : os compostos C1 e C3, derivados da astilbina e os compostos C4, C9, C11 e C12 ,derivados da xantoxilina, foram administrados

por via intraperitoneal (2,5 - 1648,3 $\mu\text{mol/kg}$) 30 min antes da injeção de formalina, respectivamente.

O composto C11, por ter apresentado maior ação analgésica, foi avaliado pelas vias intraperitoneal, subcutânea (2,5 - 508,9 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), oral (76,3 - 1017,8 $\mu\text{mol/kg}$), intracerebroventricular (2,5 - 254,5 nmol/sítio), intratecal (1,0 - 100,0 nmol/sítio) ou subplantar (injetado em associação com a formalina) (0,01 - 1000,0 $\mu\text{mol/pata}$).

Para a administração intracerebroventricular (i.c.v.), os animais foram levemente anestesiados com éter e um volume de 5 μl de salina estéril contendo o composto C11 (2,5- 254,5 nmol/sítio) ou morfina (1,3 - 10,6 nmol/sítio) foi injetado dentro do ventrículo lateral dos animais (coordenadas para localização em relação ao bregma: 1mm lateral, 1mm rostral, -3 mm vertical) como descrito previamente (Laursen e Belknap, 1986; Durcan e Morgan, 1991; Gelgor et al., 1992). Os animais controle receberam mesmo volume de uma solução de NaCl a 0,9% (salina), e cinco minutos depois da administração do composto C11, morfina ou salina os animais receberam injeção intraplantar de formalina. Ambas as fases da dor induzida pela formalina foram avaliadas como descrito acima.

Para a administração intratecal, foi adaptado o método descrito previamente por Hylden e Wilcox (1980). Os animais foram levemente anestesiados com éter e

um volume de 5µl de salina estéril (controle) ou contendo o composto C11 (1,0 - 100,0 nmol/sítio) ou morfina (0,1 - 13,0 nmol/sítio), foi injetado entre L5 e L6 usando uma microseringa conectada a um tubo de polietileno. Após 5 min, os animais receberam a injeção intraplantar de formalina e as respostas nociceptiva foram avaliadas conforme descrito anteriormente.

Outros grupos de animais foram tratados com a morfina por via subcutânea (2,6 - 13,3 µmol/kg) 30 min antes dos testes. A aspirina (55,5 - 3330,6 µmol/kg) e o acetaminofeno (66,2 - 3969,6 µmol/kg), foram administrados por via intraperitoneal ou oral, 30 e 60 minutos antes da injeção de formalina, respectivamente.

Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com salina) foi considerada como índice de edema.

3 - Dor induzida pela capsaicina em camundongos

Esse modelo foi proposto por Sakurada *et al.* (1992) e demonstrou ser adequado para o estudo de compostos que atuam preferencialmente sobre a dor de origem neurôgenica. A injeção intraplantar de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários neuropeptídeos

envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as neurocininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (Sakurada *et al.*, 1992; 1993). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de estudar com maiores detalhes a possível interação do composto C11 com o sistema neurocininérgico.

Cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20 min sendo posteriormente observada a reação à dor induzida pela capsaicina, cronometrando-se durante 5 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata, sendo esse tempo tomado como índice de nocicepção. Cada animal recebeu 20 μ l de solução de capsaicina (1,6 μ g/pata), que foi injetada diretamente na região intraplantar da pata posterior direita.

Os animais foram tratados com o composto C11 por via sistêmica (2,5 - 152,7 μ mol/kg, i.p.), por via subplantar (0,1 - 100,0 μ mol/pata, injetado em associação com capsaicina), ou por via intracerebroventricular (i.c.v.) (2,5 - 254,5 nmol/sítio). Outros grupos de animais foram pré-tratados com morfina, usada como droga padrão, por via subcutânea (1,3 - 6,7 μ mol/kg), por via tópica (10,0 - 1000,0 nmol/pata) ou por via intracerebroventricular (1,3 - 10,6 nmol/sítio). Os animais controles (salina) receberam volume semelhante de solução de NaCl 0,9% (salina) sistêmica (10ml/kg), topicamente (20 μ l/pata) ou intracerebroventricular (5 μ l/sítio).

4 - Teste do tail-flick em camundongos

A atividade analgésica do composto C11 foi analisada a seguir no teste do tail-flick, um modelo de dor sensível à drogas que atuam centralmente, como a morfina e seus derivados. Foi utilizado o aparelho do tail-flick (Albarsch, model Tail-flick analgesia meter) para medir o tempo de reação (s) à exposição ao feixe de luz (90 watts) incidido sobre a cauda dos animais, de acordo com o método descrito previamente por D'Amour e Smith (1941).

Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que permaneceram por um período superior a 8s no aparelho. Os animais normalmente respondem ao estímulo térmico (feixe luminoso) movendo sua cauda, expondo assim uma fotocélula localizada na base do aparelho, que controla o tempo em que o animal permanece com o feixe de luz incidido sobre sua cauda. O tempo máximo permitido de permanência do estímulo nocivo sobre a cauda do animal foi de 20 s. Os animais foram pré-tratados com salina (controle, 10 ml/kg), com o composto C11 por via intraperitoneal (76,3 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$) ou com morfina por via subcutânea (2,6 - 26,0 $\mu\text{mol/kg}$) 30 min antes dos experimentos. Outro grupo de animais foi pré-tratado com naloxona, um antagonista opióide não seletivo (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes do tratamento

dos animais com salina (10 ml/kg), com o composto C11 (152,7 $\mu\text{mol/kg}$,i.p.) ou com morfina (13,7 $\mu\text{mol/kg}$). O grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir o composto C11 e a morfina.

5 - Teste da placa quente em camundongos

O teste da placa quente possui, de maneira geral, as mesmas características e sensibilidade que o modelo do tail-flick, ou seja, as drogas que apresentam efeito analgésico no teste do tail-flick geralmente também são ativas no teste da placa quente. Para a realização desses experimentos os animais foram colocados dentro de um cilindro de vidro, sobre a superfície de uma placa de metal previamente aquecida à $56 \pm 1^\circ \text{C}$, utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Modelo-DS 37). O tempo em segundos em que o animal levou para lambe, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo, conforme descrito anteriormente (Eddy e Leimback, 1953). Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos de acordo com sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram por um período superior a 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s., sendo esse tempo considerado com índice total de analgesia.

Os animais foram pré-tratados com o composto C11 (76,3 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou com morfina (8,0 - 26,0 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., utilizada para comparar com o efeito dos compostos) 30 min antes do experimento. Outro grupo de animais foi pré-tratado com naloxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 10 min antes do tratamento com salina, composto C11 ou morfina. Os grupos controle receberam o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os compostos ou morfina.

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

O objetivo deste teste foi evidenciar o possível efeito depressor do composto C11 sobre o sistema nervoso central ou periférico. Os animais foram analisados no teste do rota-rod, que permite evidenciar o possível efeito dos compostos sobre a performance motora, independentemente de atuar ao nível do sistema nervoso central ou periférico (Duham e Miya, 1957; Rosland *et al*,1990).

Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho rota-rod (constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em 6 compartimentos girando a 14 r.p.m., colocada a 25 cm de altura) por, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60 s cada, conforme descrito por Duham e Miya (1957). Os animais selecionados foram tratados com o composto C11 por via intraperitoneal (152,7 $\mu\text{mol/kg}$) ou por via i.c.v. (254,5 nmol/sítio), 30 e 5 min, respectivamente , com diazepam (17,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., usado como um controle positivo) ou com os veículos (10ml/kg ou 5

$\mu\text{l/sítio}$) utilizados para diluir o composto e a droga-padrão, respectivamente. A seguir, os animais foram analisados no aparelho do rota-rod, por um período de 60 s, 30 min e 5 min após o tratamento com as drogas ou com veículo.

7 - Modelo da hiperalgesia por pressão na pata de ratos (Randall- Selitto)

Neste teste uma pressão (g) , que aumenta gradativamente, é aplicada na pata direita posterior dos ratos. A pressão é descontinuada assim que os animais apresentam uma reação típica de medo com dor e retirada da pata (Ugo Basile, modelo 7200). A intensidade da hiperalgesia foi quantificada com a variação do tempo na reação. A hiperalgesia foi induzida pela injeção subcutânea de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$, 4 horas antes do início dos experimentos) na pata direita dos animais. A pata esquerda recebeu igual volume de salina. Os animais foram pré-tratados com o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 30 minutos antes do início dos testes. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir o composto

C - Estudo do mecanismo de ação analgésica do composto C11 em camundongos.

1 - Participação da via do óxido nítrico na ação antinociceptiva do composto C11 no modelo das contorções abdominais

Com o objetivo de investigar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico no efeito analgésico do composto C11 , os animais foram pré-tratados com L-

arginina (1719,2 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.), 10 min antes da administração do composto C11 (2,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou morfina (1,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou do veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético. O número de contorções abdominais foi cumulativamente contado por um período de 20 minutos após a injeção intraperitoneal de ácido acético.

Outros grupos de animais receberam o precursor do óxido nítrico, L-arginina (3438,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e decorridos 10 min, foram tratados com o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG, 273,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase). Decorridos 30 min do tratamento, os animais foram analisados em relação à primeira e à segunda fase da dor induzida pela injeção de formalina. Os animais controles foram tratados com o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), L-NOARG (273,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

2 - Participação do sistema GABAérgico na ação antinociceptiva do composto C11 no modelo das contorções abdominais

Para avaliar a participação do sistema GABAérgico no efeito analgésico causado pelo composto C11, outro grupo de animais foi pré-tratado com faclofen (40 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., antagonista seletivo de GABA_B), 10 min antes da administração do composto C11 (2,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), baclofen (4,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., agonista seletivo do receptor de GABA_B) ou com veículo 30 min. após a administração do composto

C11, baclofen ou o veículo. A seguir, foi avaliado o efeito antinociceptivo do composto no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

3 - Participação do sistema opióide na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina

Para investigar a participação do sistema opióide sobre o efeito analgésico produzido pelo composto C11, os animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes da administração do composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ou da injeção de morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c, utilizada como controle positivo). Decorridos 30 min após a administração do composto ou morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à primeira e à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos controles foram tratados com composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir o composto C11 e a morfina, 30 min antes da injeção da formalina.

4 - Possível participação do sistema adrenérgico na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema adrenérgico na ação analgésica induzida pelo composto C11, os animais foram tratados com um antagonista de adrenoceptor alfa 1 (prazosin, 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Decorridos 10 min, os animais receberam o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou o agonista do

adrenoceptor alfa 1 (fenilefrina 49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Trinta minutos após a administração dos compostos e/ou drogas, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à primeira e à segunda fase da dor induzida pela injeção de formalina em camundongos. Os grupos controle receberam somente o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), o agonista adrenérgico fenilefrina (49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou o veículo (10 ml/kg, i.p.) utilizado para diluir o composto C11 e as drogas, 30 min antes da injeção de formalina. Outro grupo de animais foi pré-tratado com antagonista alfa 2 adrenérgico (ioimbina, 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Decorridos 10 min, os animais receberam o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Trinta minutos após a administração do composto C11, foi avaliado o efeito do tratamento em relação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

5 - Participação do sistema serotoninérgico na antinocicepção do composto C11 no modelo da formalina

Para investigar a possível participação do sistema serotoninérgico na ação analgésica do composto C11, outros grupos de animais foram pré-tratados com DL-p-clorofenilalanina metil ester (PCPA inibidor da síntese de serotonina) (399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., 1 vez ao dia, durante 4 dias). Transcorridos 30 min após o último tratamento, os animais receberam o composto C11 (76,3 e 2,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (8,0 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou somente os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir o composto ou a morfina. Decorridos 30 min, os animais foram analisados em

relação à primeira e à segunda fase da dor no modelo da formalina. Os animais controles receberam o composto C11 (76,3 e 2,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (8, 0 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina.

6 - Participação dos glicocorticóides endógenos no efeito antinociceptivo do composto C11 no modelo da formalina

Para avaliar a participação dos glicocorticóides endógenos na ação antinociceptiva causada pelo composto C11, os animais foram previamente adrenalectomizados bilateralmente através de uma incisão dorsal, sob anestesia de éter, com a retirada de ambas as glândulas adrenais, como descrito por Flower *et al.*, (1986). Após cirurgia os animais retornaram para o biotério, com livre acesso a ração sendo a água substituída por solução de salina (NaCl 0,9%), a fim de manter a concentração plasmática fisiológica de sódio. Outro grupo de animais, chamado de falso-operados, foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, mas as adrenais não foram retiradas. Esses animais receberam ração e água normalmente durante os experimentos. Decorridas 2 semanas após a cirurgia, os animais receberam o composto C11 (2,5 - 508,9 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou somente o veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

Drogas e soluções usadas

As seguintes drogas e soluções foram utilizadas: ácido acético, formalina, hidrocloreto de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), Ng- nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, hidrocloreto de DL-p-clorofenilalanina-metil-ester (PCPA), hidrocloreto de fenilefrina, ioimbina, aspirina, acetoaminofen , (Sigma Chemical CO, St Luis, MO, EUA), capsaicina (Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA), prazosin (Pfizer, Nova Iorque, EUA), hidrocloreto de naloxona (Dupont, Garden City, EUA), diazepam (Cristália, São Paulo, Brasil). A astilbina, xantoxilina e seus derivados (compostos C1- C12) foram sintetizados no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina . Todos os produtos utilizados apresentaram um alto grau de pureza (98%). A maioria das drogas foi dissolvida em salina (NaCl 0,9%), com exceção da astilbina, xantoxilina e seus derivados que foram dissolvidos com 1 gota de Tween 80 (Merck, AG Darmstadt, Alemanha) sendo o volume completado com uma solução de NaCl à 0,9%, a capsaicina dissolvida em etanol absoluto, e a aspirina e o acetaminofeno que foram dissolvidos em solução de carboximetilcelulose à 0,5% completando o volume com uma solução de NaCl à 0,9%. A concentração de Tween 80 ou etanol não excedeu 5% da concentração final, que em experimentos controle mostrou não ter influência sobre os efeitos causados pelas drogas e compostos.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50} s (doses das drogas ou compostos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95% (Fleming *et al.*, 1972). As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e/ou Newman Keuls quando necessário. Valores de $P < 0,05$, ou menos, foram considerados como indicativos de significância. As DI_{50} s foram estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica em papel semilogarítmico.

RESULTADOS

Efeito antinociceptivo produzido pela astilbina e xantoxilina e seus derivados na dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético

Os resultados apresentados na figura 2 demonstraram que a astilbina e seus derivados C1 e C3 (8,3 - 182,9 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., administrados entre 0,5 a 3 horas antes dos experimentos) inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. O composto C2 (19,4 - 169,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ao contrário dos demais compostos do grupo, não apresentou efeito analgésico significativo (resultados não mostrados).

A figura 3 mostra que a xantoxilina e seus derivados C4 e C7 (36,3 - 363,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., administrados entre 0,5 até 3 horas antes dos experimentos) inibiram significativamente as contorções abdominais, sendo que nesse grupo, apenas o composto C4 apresentou efeito dose-dependente, com a DI_{50} ($\mu\text{mol/kg}$) (juntamente com o intervalo de confiança) de 81,0 (58,0 - 113,0). Já os compostos C8 e C9 (82,4 - 549,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., administrados entre 0,5 - 4 horas antes dos experimentos), inibiram de maneira dose e tempo dependentes as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (efeito até 3 horas) (figura 4). As DI_{50} s

médias ($\mu\text{mol/kg}$) foram de 137,0 (128,0 - 146,0) e 102,0 (90,0 - 115,0) para os compostos C8 e C9, respectivamente (figura 4).

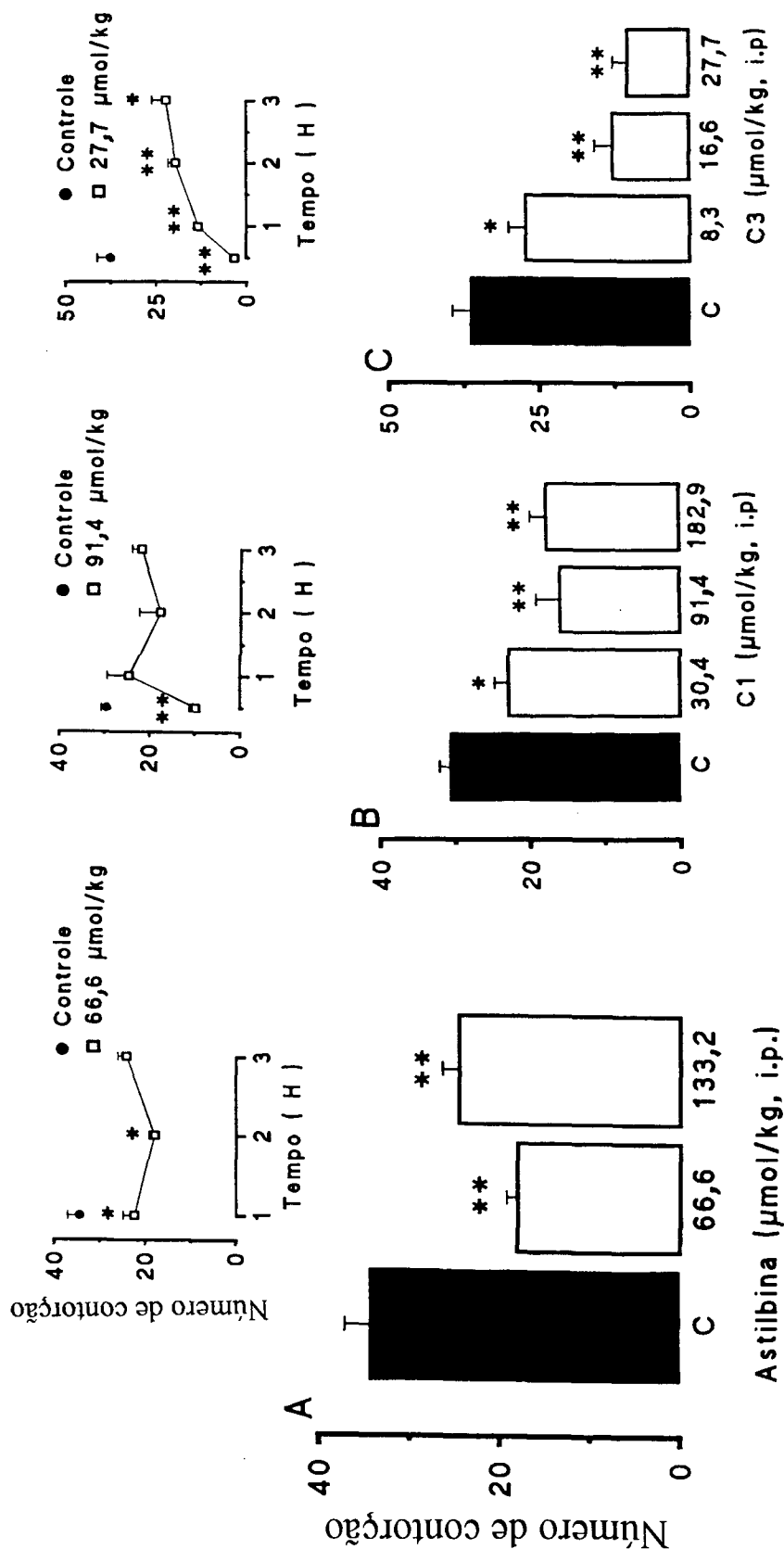


FIGURA 2 - Efeito analgésico causado pela astilbina e seus derivados os compostos C1 e C3 administrados por via intraperitoneal (painel inferior), e tempo de duração (painel superior), em relação as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente em relação ao grupo controle (C, coluna cheia), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

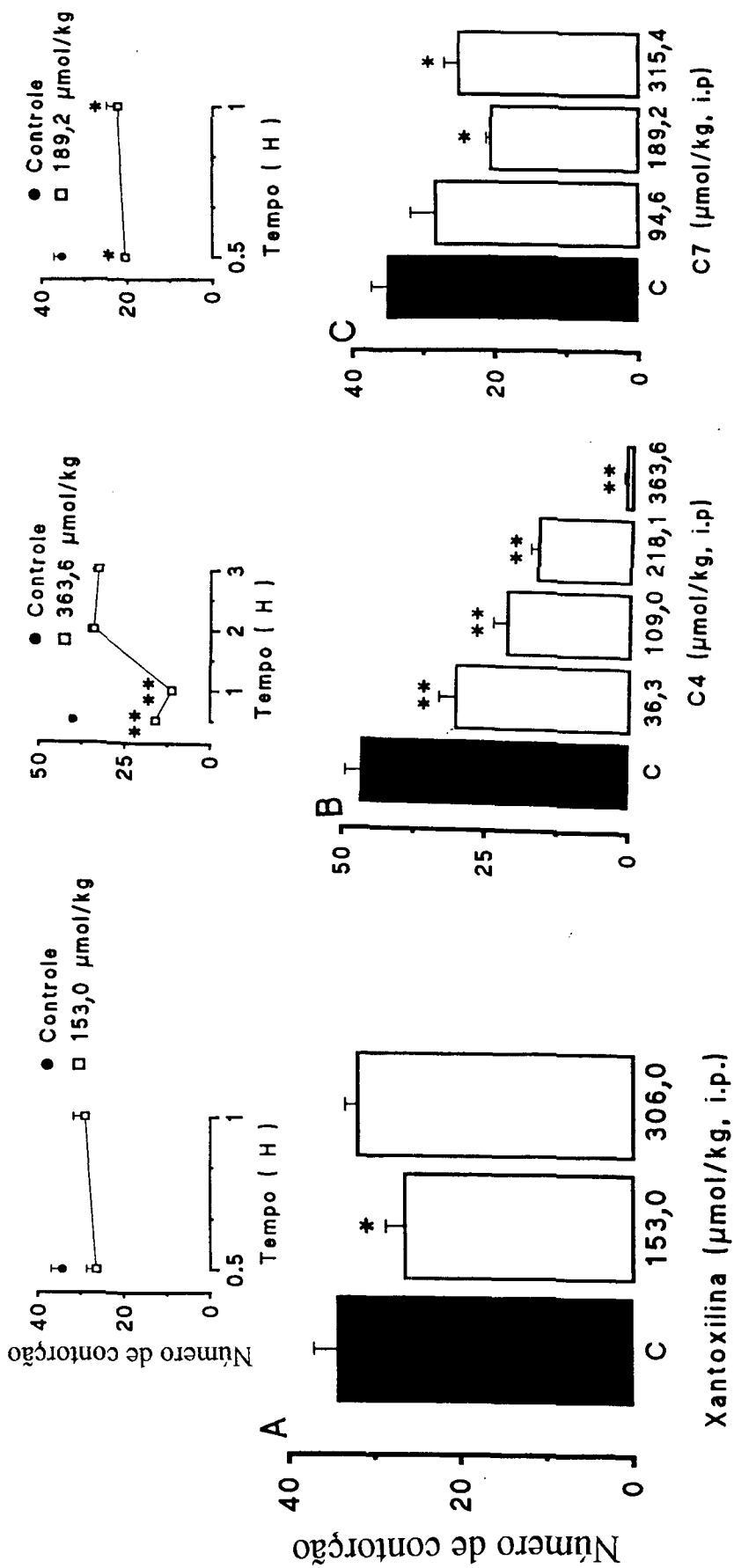


FIGURA 3 - Efeito analgésico causado pela xantoxilina e seus derivados os compostos C4 e C7 administrado por via intraperitoneal (painel inferior), e tempo de duração (painel superior) em relação as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente em relação ao grupo controle (C, coluna cheia), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

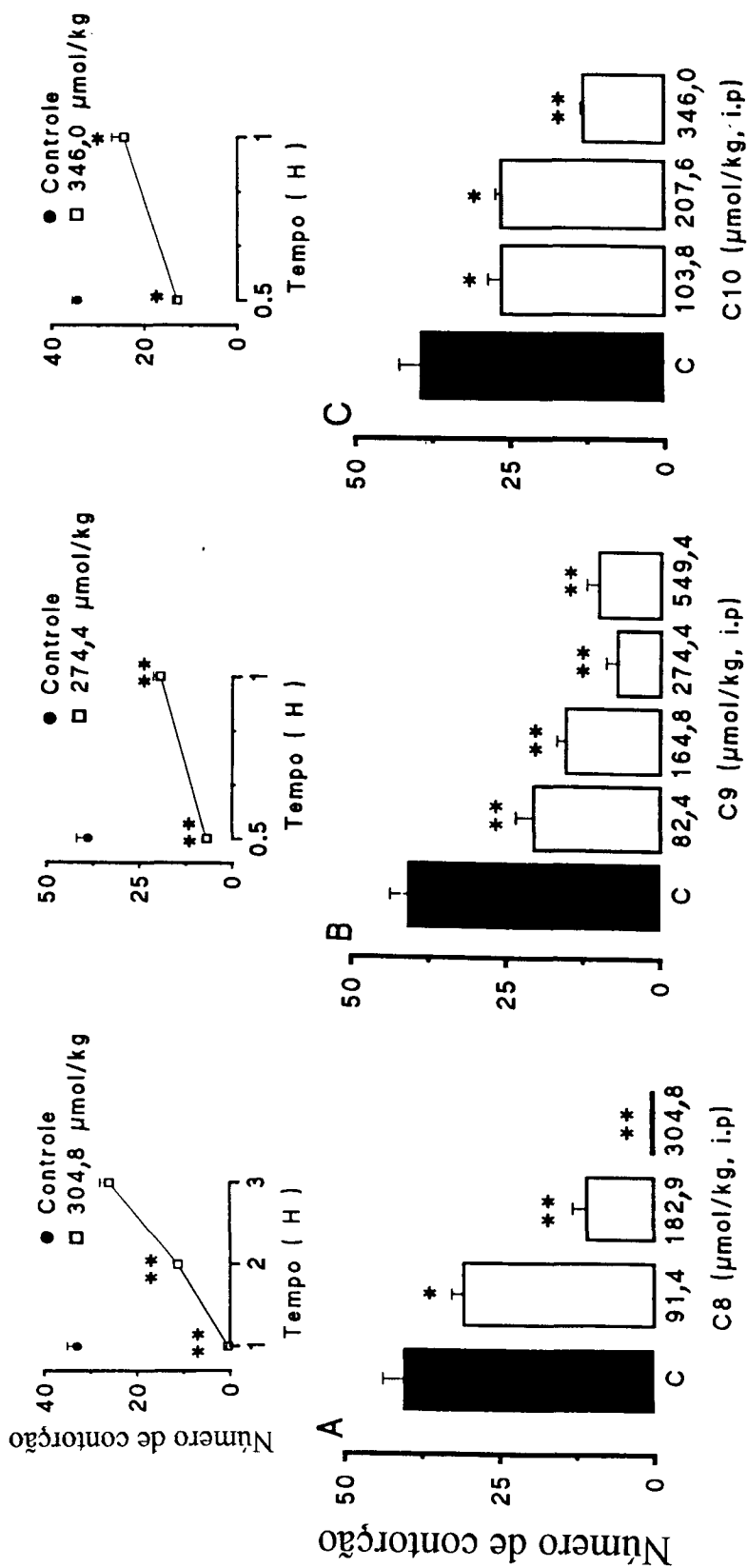


FIGURA 4 - Efeito analgésico causado pelos compostos C8, C9 e C10 derivados da xantoxilina, quando administrados por via intraperitoneal (painel inferior), e tempo de duração (painel superior) em relação as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente em relação ao grupo controle (C, coluna cheia), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Os resultados apresentados na figura 5 demonstram que os compostos C11 e C12 derivados da xantoxilina, administrados intraperitonealmente (0,8 - 165,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., entre 0,5 - 4 horas antes dos experimentos), inibiram de forma significativa e com longa duração de ação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As $\text{DI}_{50\text{s}}$ médias ($\mu\text{mol/kg}$) foram : 1,3 (0,8 -2,0) e 18,0 (11,0 - 32,0), respectivamente. Os compostos C5 e C6 (19,4 - 169,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ao contrário dos demais compostos do grupo, não apresentaram efeito analgésico significativo (resultados não mostrados).

A aspirina e o acetaminofeno, utilizados como drogas-padrão, administrados intraperitonealmente (55,5 - 1323,2 $\mu\text{mol/kg}$ 30 min antes), causaram inibição significativa e de maneira dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético. As $\text{DI}_{50\text{s}}$ médias ($\mu\text{mol/kg}$) foram de 133,2 (72,7 - 243,1) e 124,3 (103,8 - 149,5), respectivamente (figura 6 A e B). Quando essas drogas foram administradas por via oral (277,5 - 1984,2 $\mu\text{mol/kg}$, 60 min antes), elas também causaram efeito analgésico dose-dependente com $\text{DI}_{50\text{s}}$ médias de 605,1 (516,2 - 705,0) e 1144,5 (708,0 - 1846,0) $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente para a aspirina e acetaminofeno (figura 6 C e D).

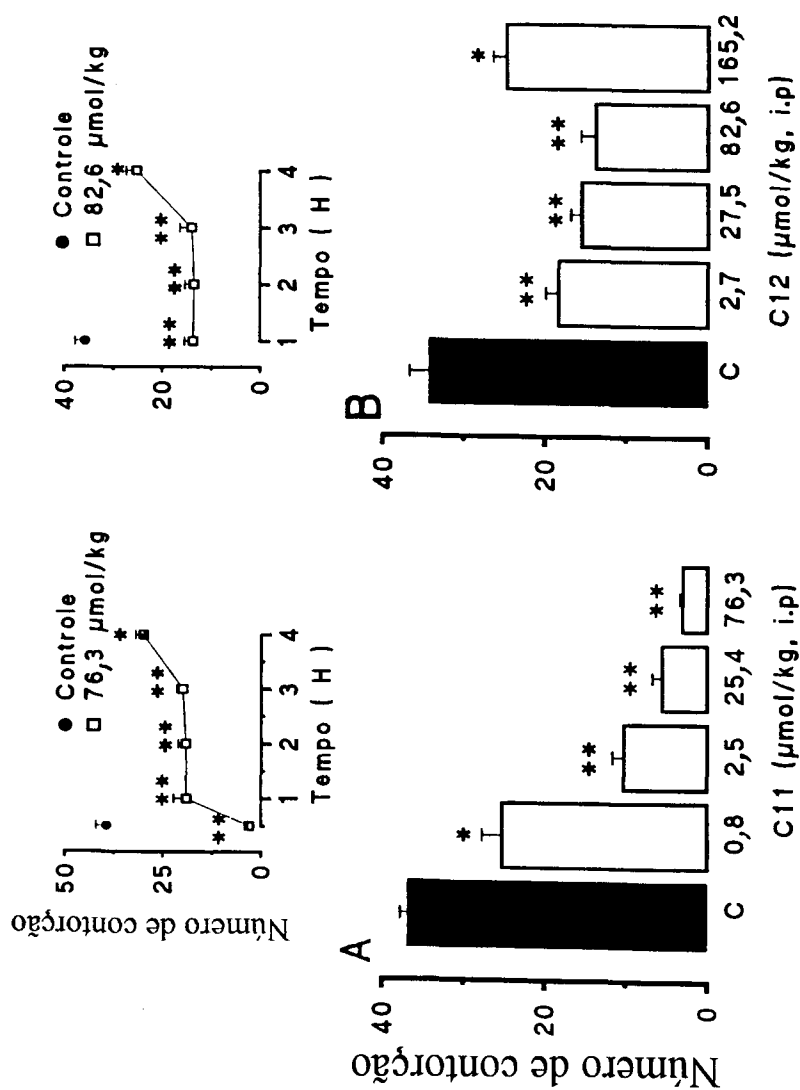


FIGURA 5 - Efeito analgésico causado pelos compostos C11 e C12 derivados da xantoxilina, quando administrados por via intraperitoneal (painel inferior), e tempo de duração (painel superior) em relação as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente em relação ao grupo controle (C, coluna cheia), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

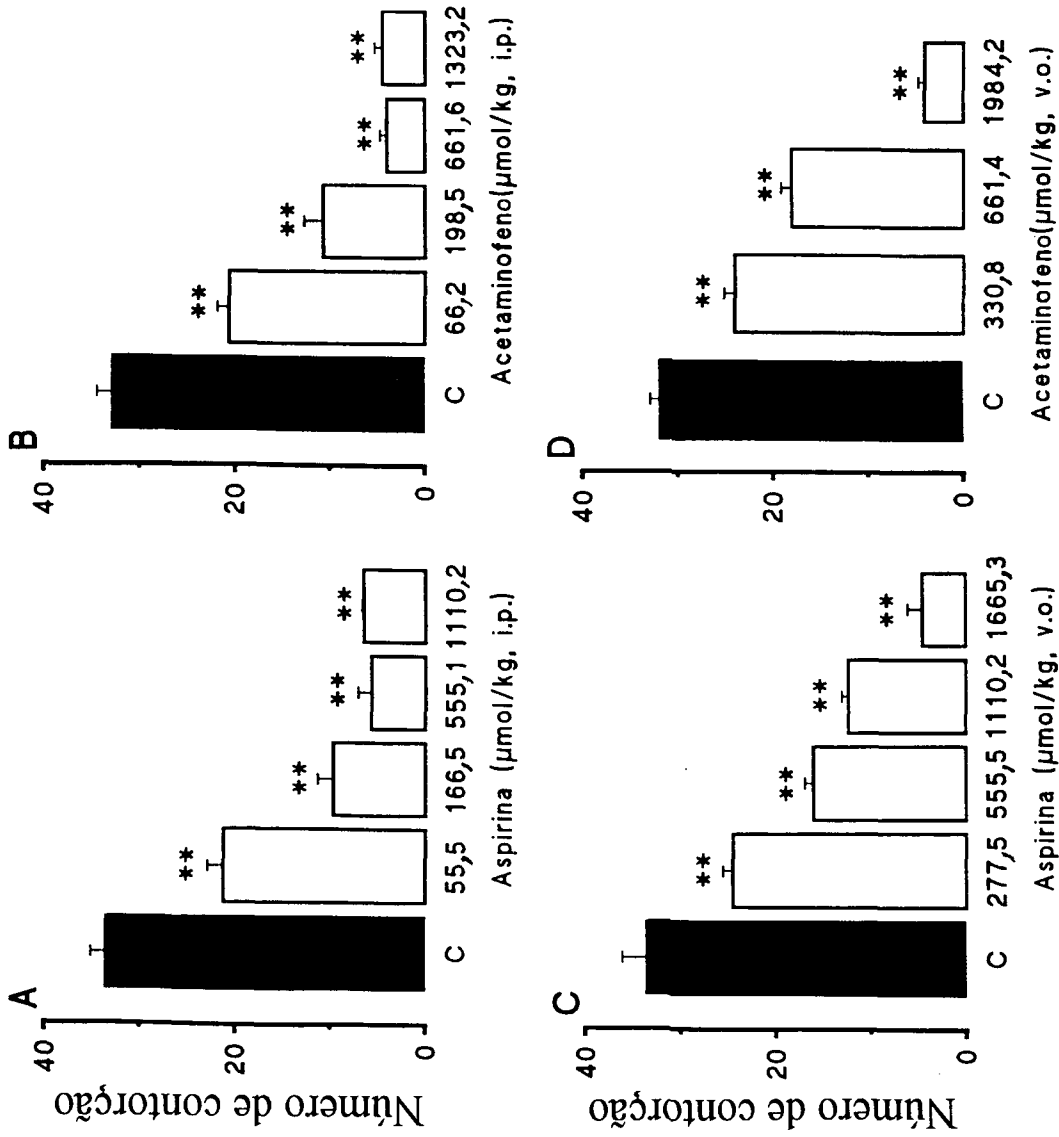


FIGURA 6 - Efeito analgésico causado pela aspirina e acetaminofeno administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou oral (painel inferior) em relação as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Efeito antinociceptivo produzido pelos derivados da astilbina e da xantoxilina sobre a dor induzida pela formalina.

Os resultados apresentados na tabela 1 demonstram que os compostos C1 e C3 (2,5 - 1648,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) derivados da astilbina, apresentaram significativo efeito analgésico quando analisados na dor inflamatória (segunda fase) induzida pela injeção intraplantar de formalina. Da mesma forma, os resultados apresentados na tabela 1 demonstram que os compostos C4, C9 e C11 (2,5 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), derivados da xantoxilina, apresentaram significativo efeito antinociceptivo quando analisados no modelo da formalina. Os resultados apresentados na figura 7 demonstram que o composto C11 administrado intraperitonealmente (2,5 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$ 30 min antes) causou inibição significativa e dose-dependente da primeira (dor neurogênica) e da segunda fases (dor inflamatória) da dor induzida pela formalina. Além disso, esse composto foi cerca de 4 vezes mais efetivo em inibir a dor inflamatória do que a neurogênica induzida pela formalina. As DI_{50} médias ($\mu\text{mol/kg}$) para a primeira e segunda fases foram de 35,9 (12,0 - 107,0) e 8,0 (5,0 - 13,0), respectivamente.

Quando o composto C11 foi administrado por via subcutânea (25,4 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$), ele causou inibição dose-dependente no modelo da dor induzida pela formalina com DI_{50} médias de 187,5 (145,5 - 241,5) e 163,1 (55,3 - 487,4). Já a morfina (2,6 - 13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), utilizada como droga-padrão apresentou efeito

significante neste modelo inibindo ambas as fases da dor induzida pela formalina com DI_{50} médias de 3,7 (2,4 - 5,4) e 4,7 (3,3 - 5,8) $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente (figura 8).

Independente da via de administração utilizada, o composto C11 não alterou significativamente o edema de pata associado com a segunda fase da dor induzida pela formalina (resultados não mostrados).

Ao contrário do que foi observado para o composto C11, a aspirina (55,5 - 110,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e o acetaminofeno (66,2 - 1323,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) administrados 30 min antes, não afetaram significativamente a primeira fase da dor induzida pela formalina, mas causaram inibição de maneira dose-dependente da segunda fase nesse modelo. As DI_{50} s médias calculadas foram de 123,0 (77,0 - 209,0) e 120,4 (90,0 - 161,0) $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente. No entanto, a aspirina e o acetaminofeno também não inibiram o edema de pata associado com a segunda fase desse modelo (figura 7).

Quando administrado oralmente, o composto C11 (doses até 254,5 $\mu\text{mol/kg}$, 60 min antes) não apresentou efeito analgésico significativo em ambas as fases da dor causada pela formalina. Em condições semelhantes, a aspirina (1110,2 - 3330,6 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) e o acetaminofeno (1323,2 - 3969,6 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) inibiram de maneira dose-dependente apenas a segunda fase da dor induzida pela formalina com

DI₅₀s médias, de 1565,3 (1348,8 - 1820,6) e 1706,8 (1422,3 - 2044,2) $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente (resultados não mostrados).

Tabela 1 -Efeito dos compostos derivados da astilbina ou da xantoxilina, administrados por via intraperitoneal em relação a dor induzida pela injeção de formalina em camundongos.

| Composto | Primeira Fase (0 - 5 min) ID ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$) | IM (%) | Segunda Fase (15 - 30 min) ID ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$) | IM (%) |
|--------------|---|------------|--|------------|
| Composto C1 | > 91 | 38 \pm 3 | 19,4 (16,0-24,0) | 58 \pm 4 |
| Composto C3 | > 83 | 47 \pm 5 | 59,4 (48,0-74,0) | 64 \pm 5 |
| Composto C4 | >109 | 17 \pm 4 | 74,0 (39,0-139,0) | 54 \pm 5 |
| Composto C9 | 810,0 (679,0-960,0) ^a | 40 \pm 4 | 274,0 (233,0-324,0) | 80 \pm 5 |
| Composto C11 | 36,0 (12,0-107,0) | 63 \pm 4 | 8,0 (5,0-13,0) | 88 \pm 6 |
| Composto C12 | inativo | - | >551 | 37 \pm 4 |

a - Limite de confiança ($P < 0,05$).

IM - inibição máxima.

Cada grupo representa a média \pm erro de 6 animais.

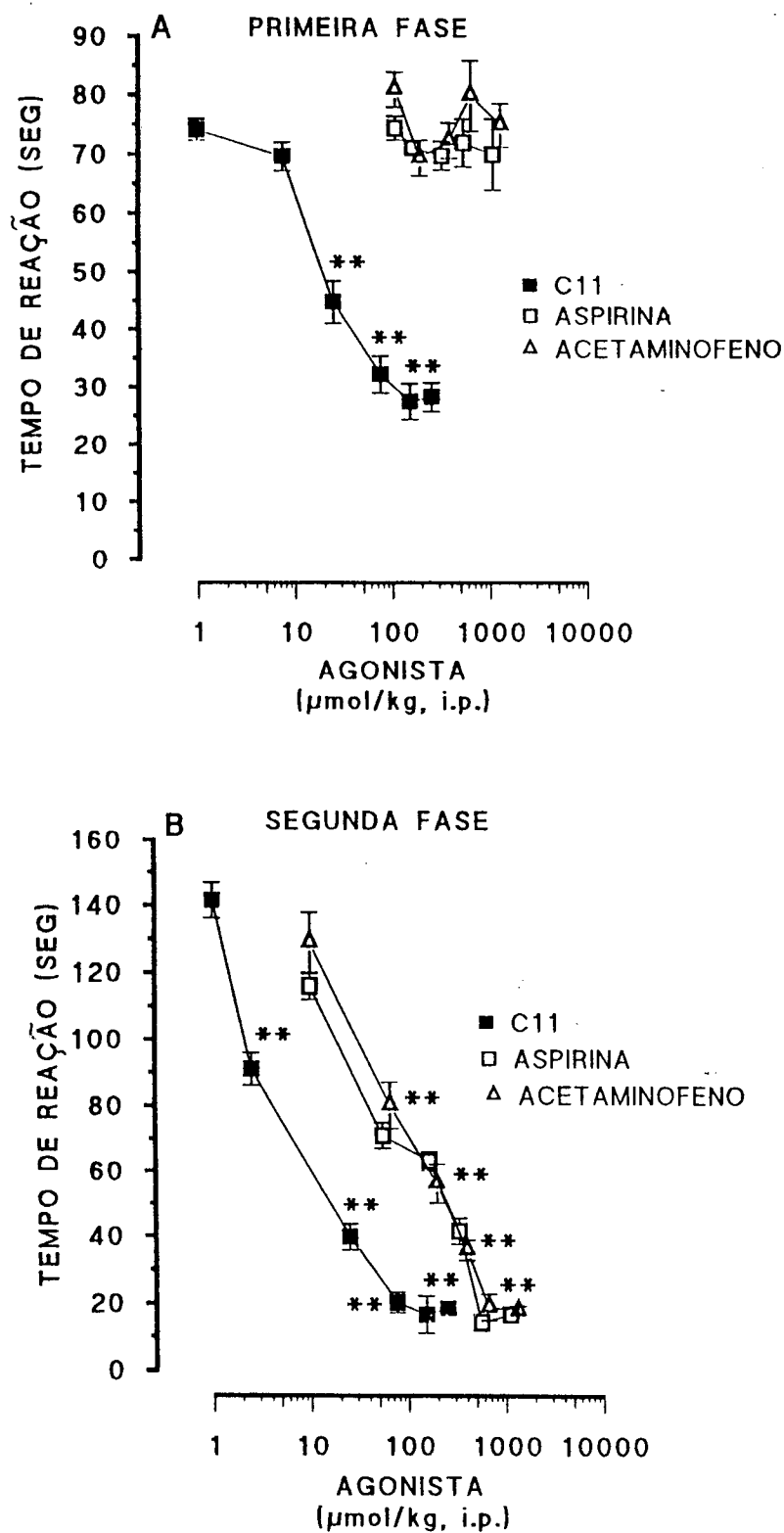


FIGURA 7 - Efeito analgésico causado pela aspirina, acetaminofeno e composto C11 por via intraperitoneal no modelo da dor induzida pela formalina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

A figura 9 mostra que o composto C11 (0,01 - 1000,0 $\mu\text{mol/pata}$) quando injetado localmente em associação com a formalina produziu inibição dose-dependente de ambas as fases da dor causada pela formalina. Contudo o composto C11 foi 25 vezes mais potente em inibir a segunda fase desse modelo. Os valores das DI_{50} médias para a primeira e a segunda fases foram de 2700 (200 - 290) e 100 (20 - 500) nmol/pata , respectivamente.

Quando administrado por via i.c.v. o composto C11 (2,5 - 254,5 nmol/sítio), como a morfina (1,3 - 10,6 nmol/sítio), causou efeito antinociceptivo dose-dependente em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (figura 10). Contudo, o nível da DI_{50} o composto C11 foi aproximadamente 5 vezes menos potente que a morfina. Os valores das DI_{50} s médias para a primeira e a segunda fase da dor no teste da formalina foram de 22,9 (12,7 - 38,2) e 21,6 (10,2 - 45,8) nmol/sítio e 4,2 (3,5 - 5) e 4,1 (3,1 - 5) nmol/sítio para o composto C11 e a morfina, respectivamente. Entretanto, o composto C11 como a morfina não afetou o edema de pata associado com a segunda fases nesse modelo (figura 10).

A figura 11 mostra que o composto C11 administrado por via intratecal (1,0 - 100,0 nmol/sítio), como a morfina (0,1 - 13,3 nmol/sítio), inibiu significativamente ambas as fases da dor induzida pela formalina. Os valores das DI_{50} s médias (nmol/sítio) foram de 25,0 (17,0 - 38,0) e 3,2 (1,9 - 5,4), e 2,4 (1,8 - 3,1) e 1,0 (0,4 - 2,6), para a primeira e segunda fase da dor induzida pela formalina,

respectivamente. Nesse modelo, o composto C11 foi cerca de 3 a 10 vezes menos potente que a morfina. Ao contrário do observado para a morfina que foi equipotente em inibir as duas fases da dor causada pela formalina, o composto C11 foi cerca de 3 vezes mais ativo em inibir a segunda fase nesse modelo.

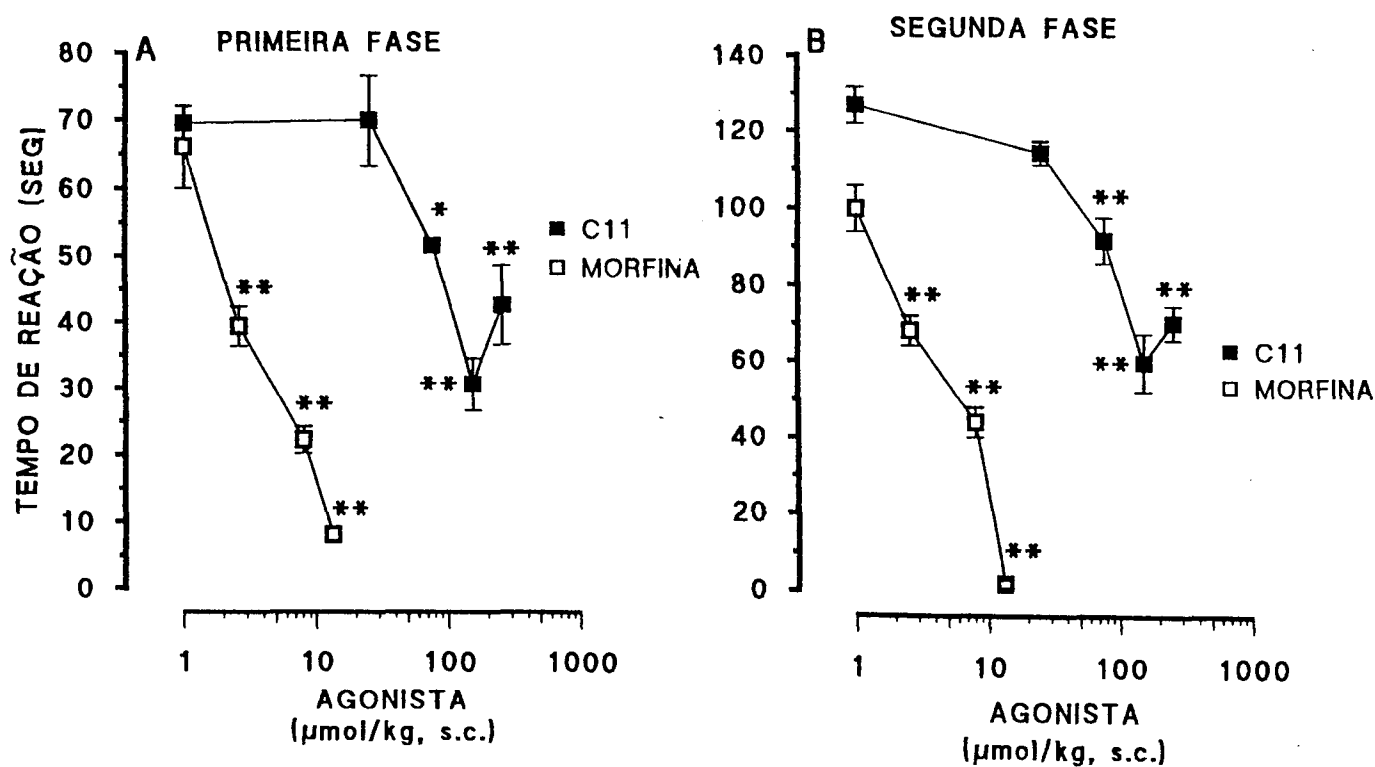


FIGURA 8 - Efeito analgésico causado pelo composto C11 por via subcutânea no modelo da dor induzida pela formalina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

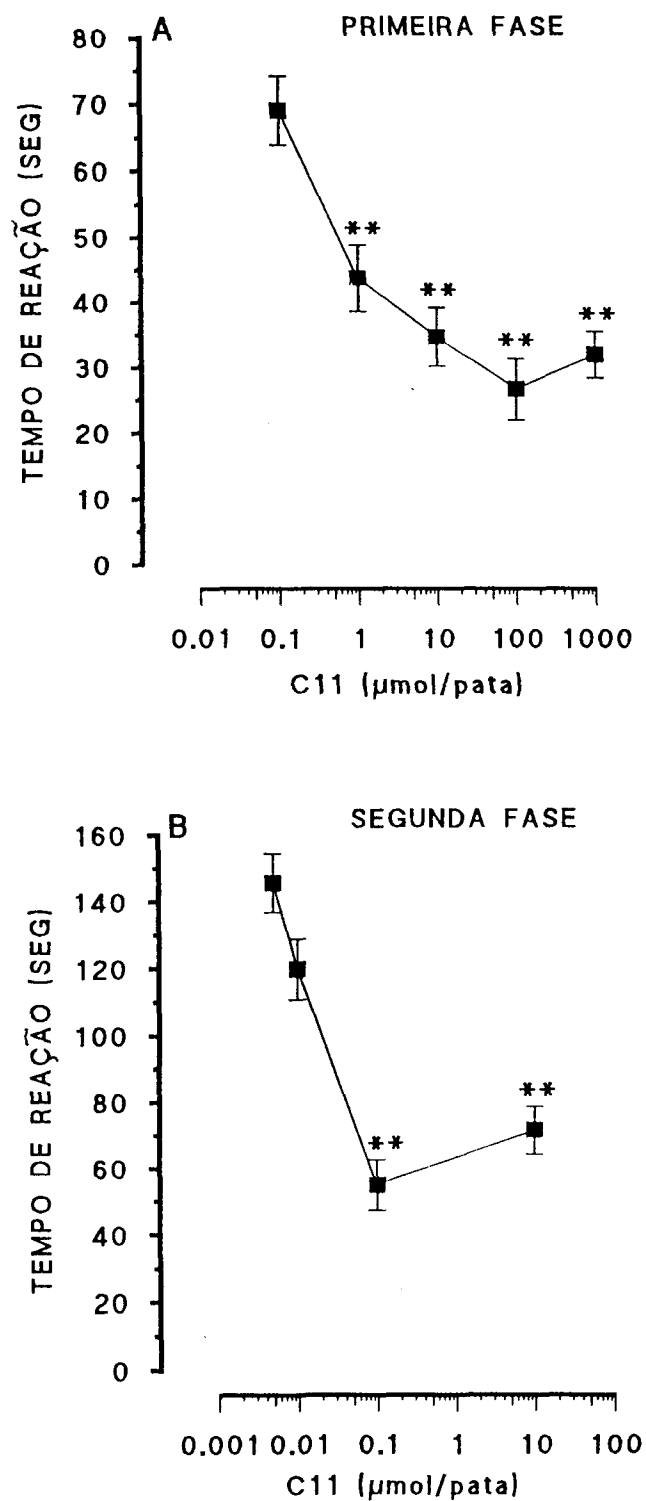


FIGURA 9 - Efeito analgésico causado pelo composto C11 por via subplantar no modelo da dor induzida pela formalina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

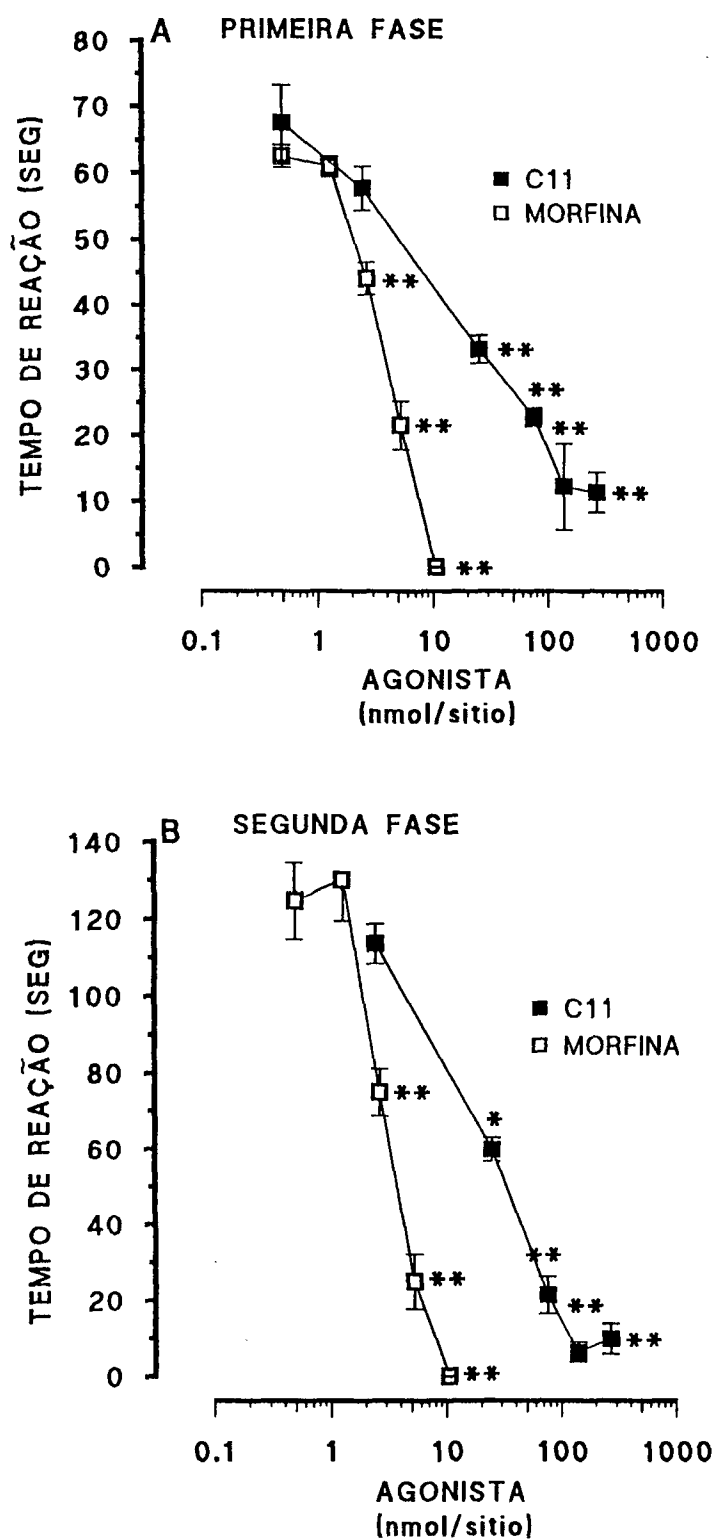


FIGURA 10 - Efeito analgésico causado pelo composto C11 e morfina por via intracerebroventricular no modelo da dor induzida pela formalina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

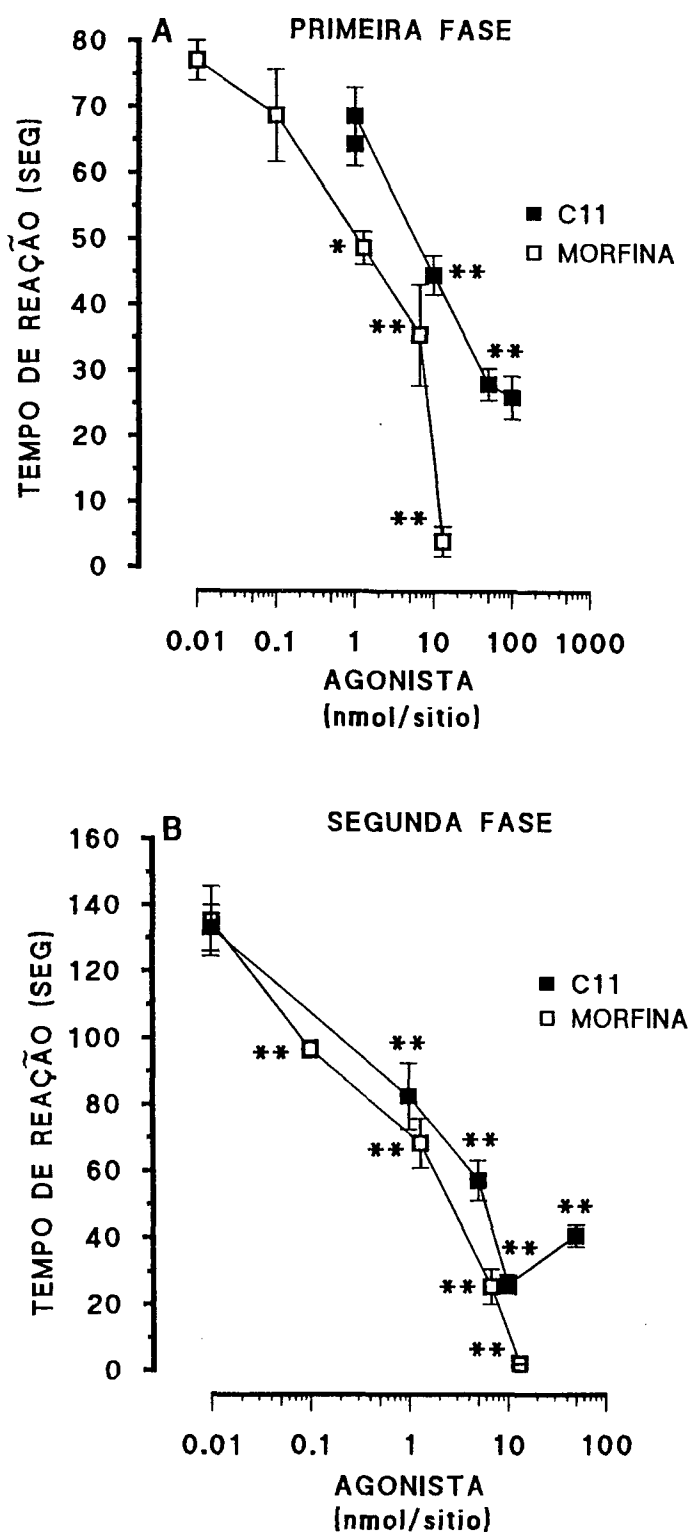


FIGURA 11 - Efeito analgésico causado pelo composto C11 e morfina por via intratecal no modelo da dor induzida pela formalina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Efeito do composto C11 sobre a dor induzida pela capsaicina

O composto C11, quando administrado por via sistêmica (2,5 - 152,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), subplantar (0,1 - 100,0 $\mu\text{mol/pata}$, injetado em associação com capsaicina) ou por via i.c.v. (2,5 - 254,5 nmol/sítio), inibiu de maneira dose-dependente a dor neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina (figura 12). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{s}}$ foram de 10,9 (7,6 - 14,3) $\mu\text{mol/kg}$, i.p., 0,5 (0,3 - 0,9) $\mu\text{mol/pata}$ e 2,5 (2,0 - 6,4) nmol/sítio , respectivamente. Nas mesmas condições, a morfina administrada por via subcutânea (1,3 - 6,7 $\mu\text{mol/kg}$), tópica (10,0 - 1000,0 nmol/pata) ou i.c.v. (1,3 - 10,6 nmol/sítio) inibiu, de maneira dose-dependente, o efeito nociceptivo causado pela capsaicina, com $\text{DI}_{50\text{s}}$ médias de 2600,0 (2000,0 - 3400,0) nmol/kg , 170,0 (50,0 - 510,0) nmol/pata e 1,3 (0,9 - 3,2) nmol/sítio , respectivamente (figura 12).

Efeito do composto C11 na hiperalgesia no teste da pressão na pata (Randall-Selitto)

O tratamento prévio dos animais com o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, 30 min antes) foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$, 4 horas antes dos testes) ($172,5 \pm 4,3\text{g}$ versus $214,0 \pm 9,4\text{g}$ na presença do composto C11) ($P < 0,01$) (resultados não mostrados).

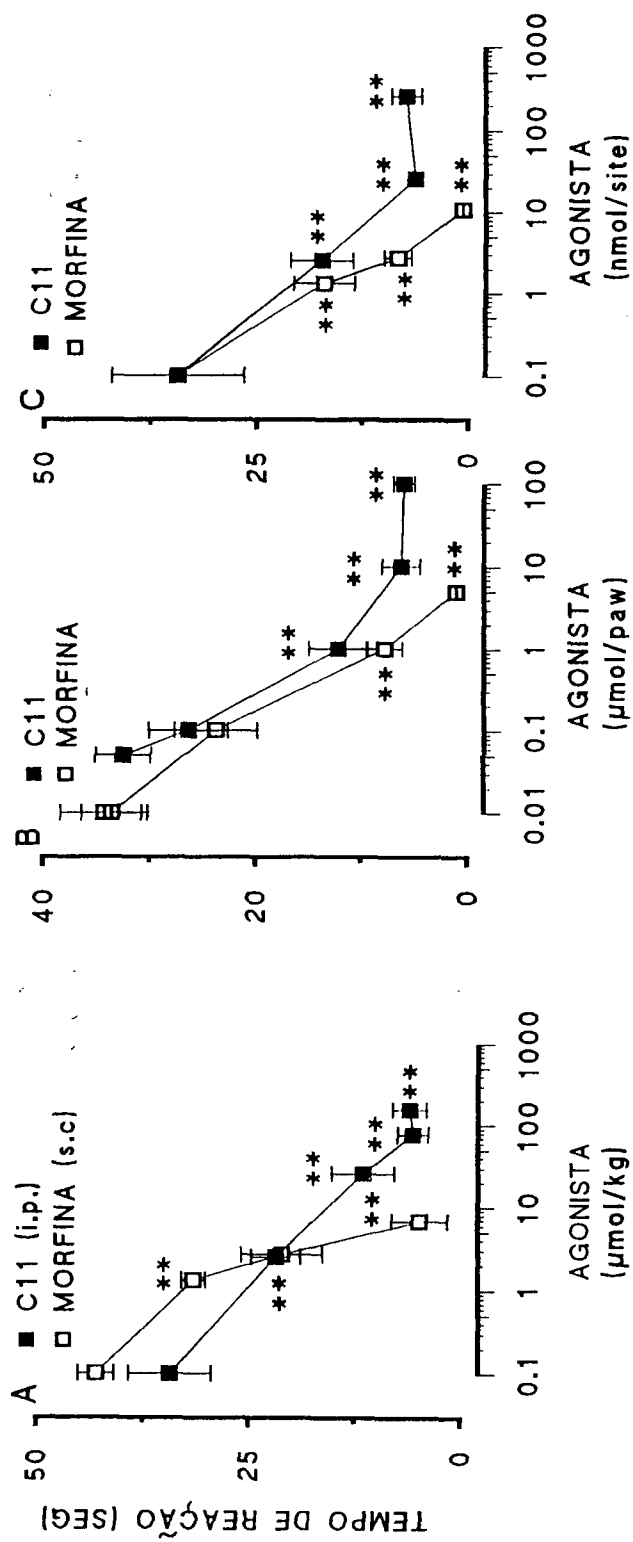


FIGURA 12 - Efeito analgésico causado pela morfina e composto C11 por via intraperitoneal (A), subplantar (B) e intracerebroventricular (C) no modelo da dor induzida pela capsaicina em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Efeito do composto C11 nos testes do tail-flick e da placa quente

Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que o composto C11 (76,3 - 254,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), como a morfina (2,6 - 26,0 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., usada como controle positivo), administrado 30 min antes dos testes, produziu aumento significativo do limiar de dor em relação a ambos os testes. A administração de naloxona (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes do tratamento com o composto C11, não foi capaz de reverter significativamente o efeito analgésico do composto C11, mas foi efetiva em reverter a ação antinociceptiva causada pela morfina (tabela 2).

Tabela 2 - Efeito antinociceptivo do composto C11 (i.p.) e morfina (s.c.) no teste da placa quente e tail-flick em camundongos.

| Drogas | Dose ($\mu\text{mol/kg}$) | Latência (s) | |
|--|--------------------------------|--------------------|------------------|
| | | Placa quente | Tail-flick |
| Controle | 0 | 4,6 \pm 0,7 | 4,6 \pm 0,5 |
| Morfina | 2,6 | - | 7,5 \pm 1,0** |
| | 8,0 | 8,8 \pm 1,0 | 10,0 \pm 0,5** |
| | 13,3 | 15,6 \pm 1,0** | 13,7 \pm 1,9** |
| | 26,0 | 20,0 \pm 0,5** | 20,0 \pm 0,5** |
| DI ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$) (e 95% L.C.) | | 12,5 (10,0 - 15,0) | 9,0 (6,0 - 10,0) |
| Naloxona | 13,7 | 4,9 \pm 0,4 | 5,0 \pm 1,0 |
| Morfina + Naloxona | 13,3 + 13,7 | 6,7 \pm 0,7* | 4,6 \pm 1,2 |
| Composto C11 | 76,3 | 5,4 \pm 0,6 | 6,4 \pm 0,4* |
| | 152,7 | 5,6 \pm 0,9* | 7,2 \pm 0,4** |
| | 254,5 | 5,7 \pm 0,5* | 6,7 \pm 0,8* |
| Composto C11 + Naloxona | 152,7 + 13,7 | 6,4 \pm 0,4* | 7,0 \pm 1,1** |

A naloxona foi injetada i.p. 10 min antes do composto C11 ou morfina.

Cada grupo representa a média \pm erro de 6 animais. ** P < 0,01 * P < 0,05 quando comparado com o grupo controle.

Efeito do composto C11 na performance motora dos animais no teste do rotarod.

O tratamento prévio dos animais com o composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 30 min antes ou por via i.c.v. (254,5 nmol/sítio) 5 min antes dos testes, não alterou significativamente a resposta motora dos animais (grupo controle $59,1 \pm 1\text{s}$ versus $58,5 \pm 1\text{s}$ na presença do composto C11). O pré-tratamento com diazepam (17,2 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) reduziu em $30 \pm 6\%$ a resposta motora dos animais (grupo controle $59,1 \pm 1\text{s}$ versus $43 \pm 6\text{s}$ nos animais pré-tratados com diazepam, $N = 10$) ($P < 0,05$) (resultados não mostrados).

Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptiva do composto C11.

Efeito do tratamento com C11 no modelo das contorções abdominais

O tratamento dos animais com L-arginina (precursor do óxido nítrico, 1719,2 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (agonista opióide não seletivo, 1,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) (figura 16). No entanto, o mesmo tratamento com L-arginina (1719,2 v.o.) não modificou o efeito antinociceptivo causado pelo composto C11 (2,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (figura 16).

Os resultados da figura 13 , mostraram que o tratamento dos animais com faclofen (antagonista de receptores GABA_B , 40 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo baclofen (agonista de

receptores $GABA_B$, 4,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). No entanto, o faclofen não alterou o efeito antinociceptivo causado pelo composto C11 (2,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (figura 13).

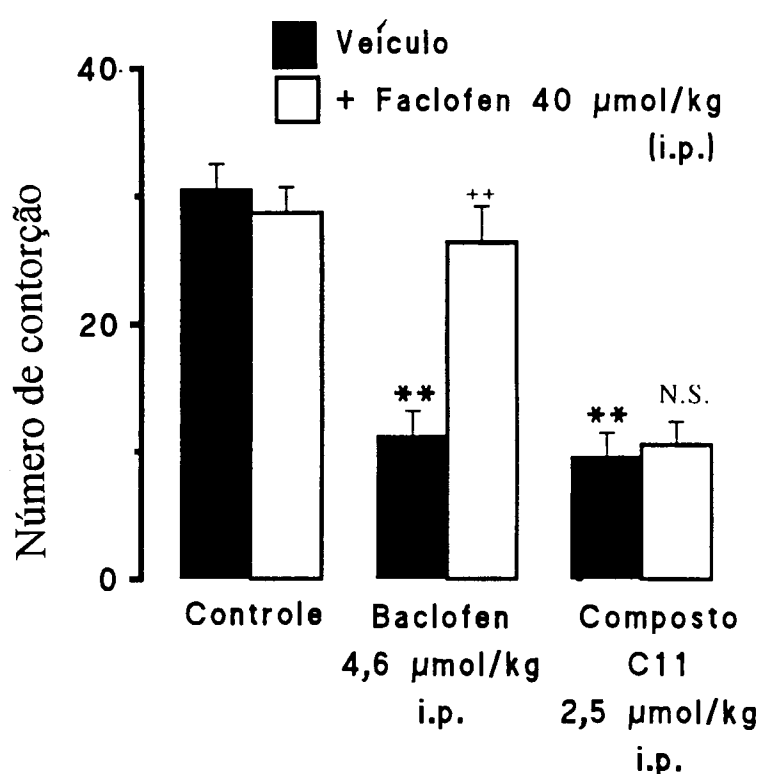


FIGURA 13 - Influência do pré-tratamento de camundongos com faclofen sobre a atividade analgésica causada pelo baclofen ou composto C11 em relação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparado com controle, ++ $P < 0,01$ quando comparado com baclofen mais veículo e N.S. (não significante) quando comparado C11 mais veículo.

Efeito do tratamento com C11 no modelo da formalina

Os resultados mostrados na da figura 14 A e B, indicam que o pré-tratamento dos animais com naloxona (antagonista opióide não seletivo, 13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes da injeção de morfina (agonista opióide, 13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina, quando analisado em relação à primeira e à segunda fase do teste de formalina. Contudo, a naloxona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$) (figura 14 A e B).

O tratamento prévio dos animais com prazosin (antagonista de adrenoceptor α_1 , 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes, reverteu completamente o efeito antinociceptivo induzido pela fenilefrina (agonista de adrenoceptor α_1 , 49, $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), mas não reverteu significativamente a nocicepção causada pelo composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) em ambas as fases no modelo da formalina (figura 15 A e B). O prévio tratamento dos animais com ioimbina (0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p. $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), não reverteu significativamente a nocicepção causada pelo composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) nas contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos (resultados não mostrados).

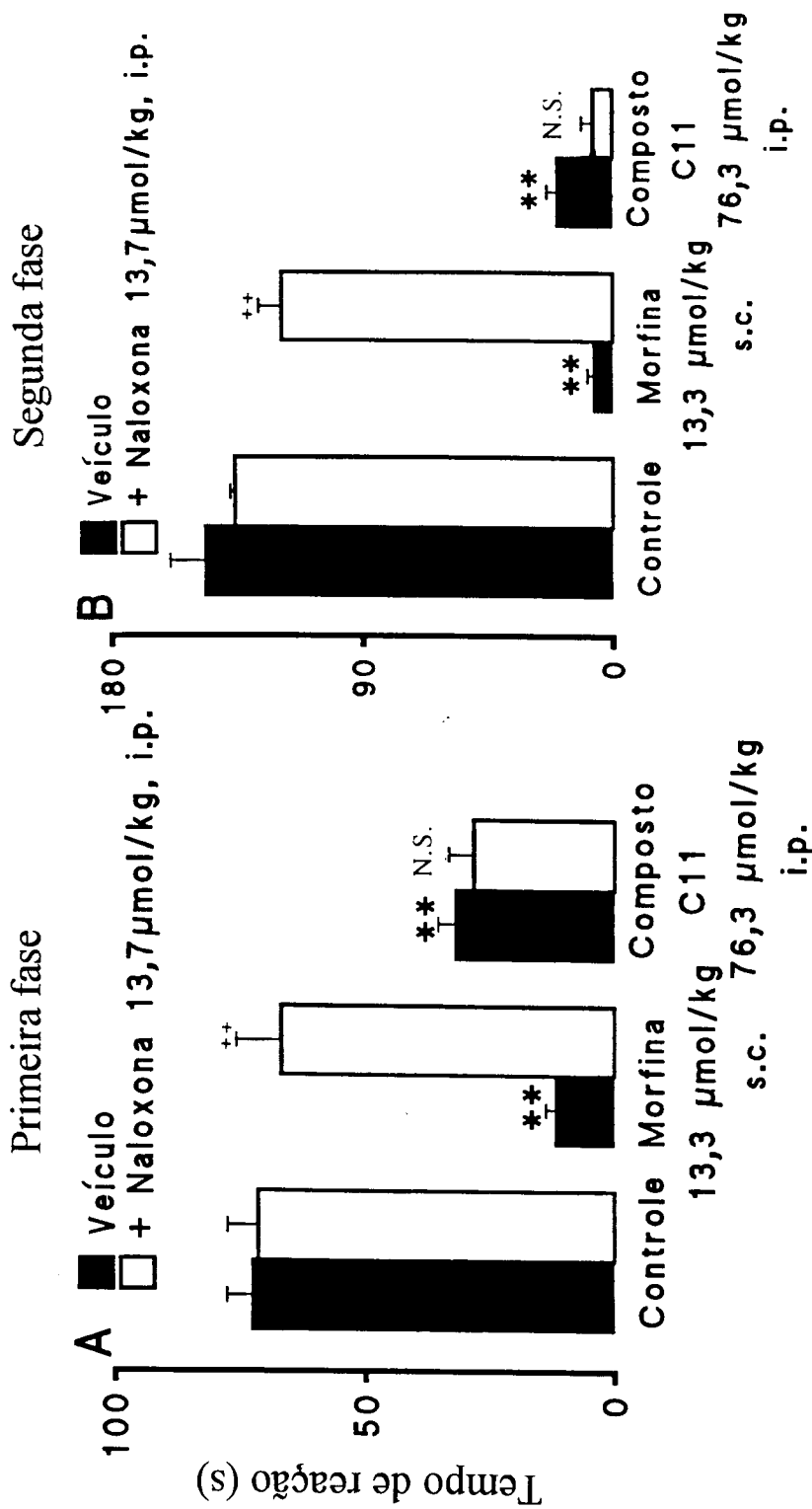


FIGURA 14 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a atividade analgésica causada pela dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M.. ** $P < 0,01$ quando comparado com controle, ++ $P < 0,01$ quando comparado morfina mais veículo e N.S. (não significante) quando comparado C11 mais veículo.

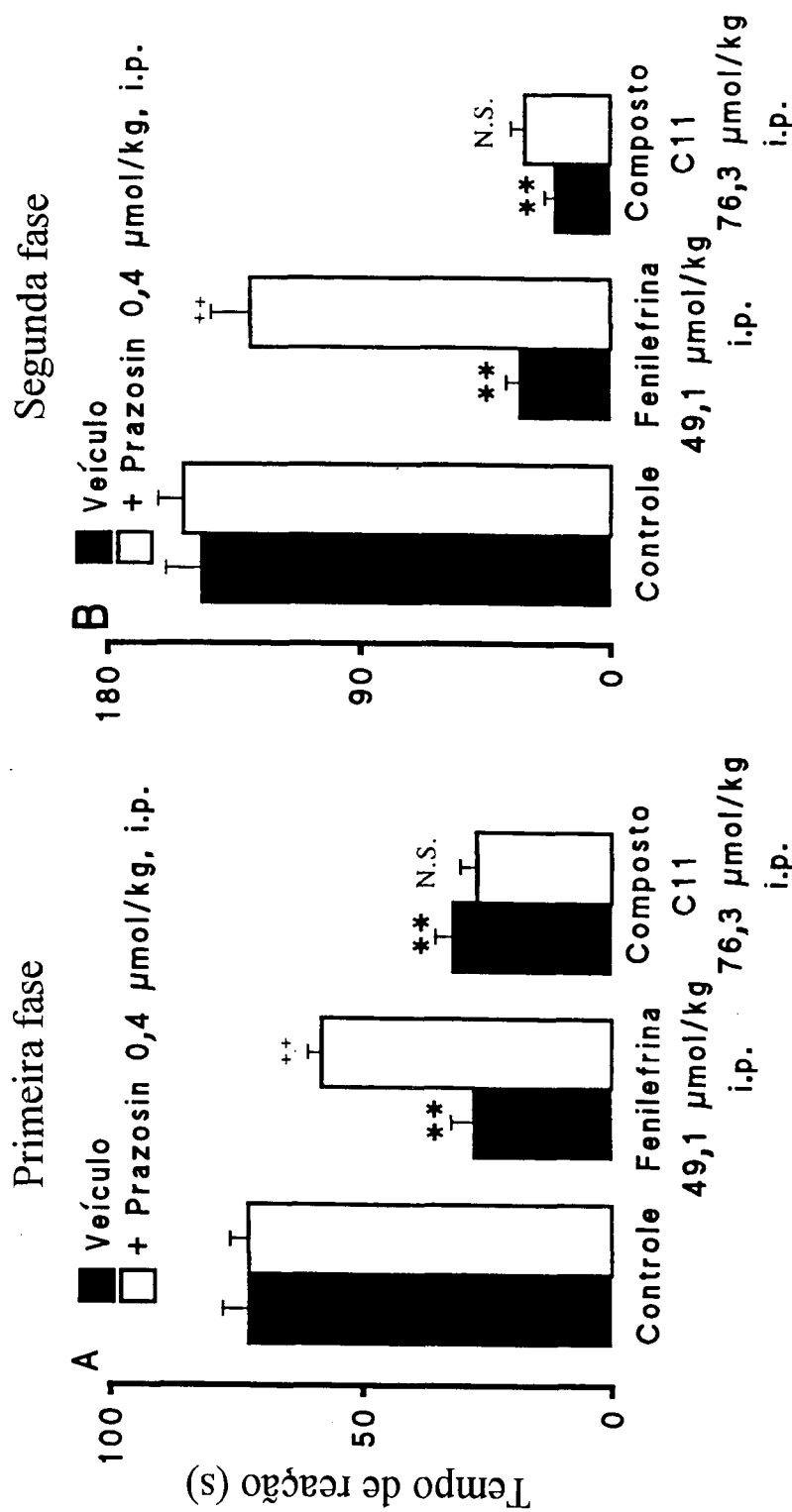


FIGURA 15 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosin sobre a atividade analgésica causada pela fenilefrina ou composto C11 em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ quando comparado com controle, ++ $P < 0,01$ quando comparado fenilefrina mais veículo, N.S. (não significante) quando comparado C11 mais veículo.

O tratamento dos animais com a L-NOARG (inibidor da enzima óxido nítrico sintase, 273,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) 30 min antes dos testes, produziu efeito analgésico significativo em ambas as fases no teste da formalina, sendo esse efeito completamente revertido pela L-arginina (3438,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando administrado 10 min antes dos experimentos (figura 16 A e B). No entanto, a L-arginina não foi capaz de reverter o efeito analgésico causado pelo composto C11 (7,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (figura 16 A e B).

A figura 17 A e B, demonstra que o pré-tratamento dos animais com PCPA (inibidor da síntese de serotonina, 399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., durante 4 dias), inibiu parcial, mas significativamente o efeito analgésico causado pela morfina (8 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou pelo composto C11 (76,3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisado no modelo de nocicepção induzido pela injeção de formalina.

Os resultados apresentados na tabela 3 mostram que a ação antinociceptiva causada pelo composto C11 (2,5 - 508,9 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) em animais previamente adrenalectomizados não foi significativamente diferente em relação aos animais controles. Figura 7 Os valores médios das $\text{ID}_{50\text{s}}$ foram de 75,0 (32,0 - 173, 0) e 4,0 (3,0 - 7,0) $\mu\text{mol/kg}$ para os animais adrenalectomizados e de 35,9 (12,0 - 106, 0) e 8,0 (5,0 - 13,4) $\mu\text{mol/kg}$ para os animais controle, em relação à primeira e à segunda fases da dor induzida pela formalina, respectivamente.

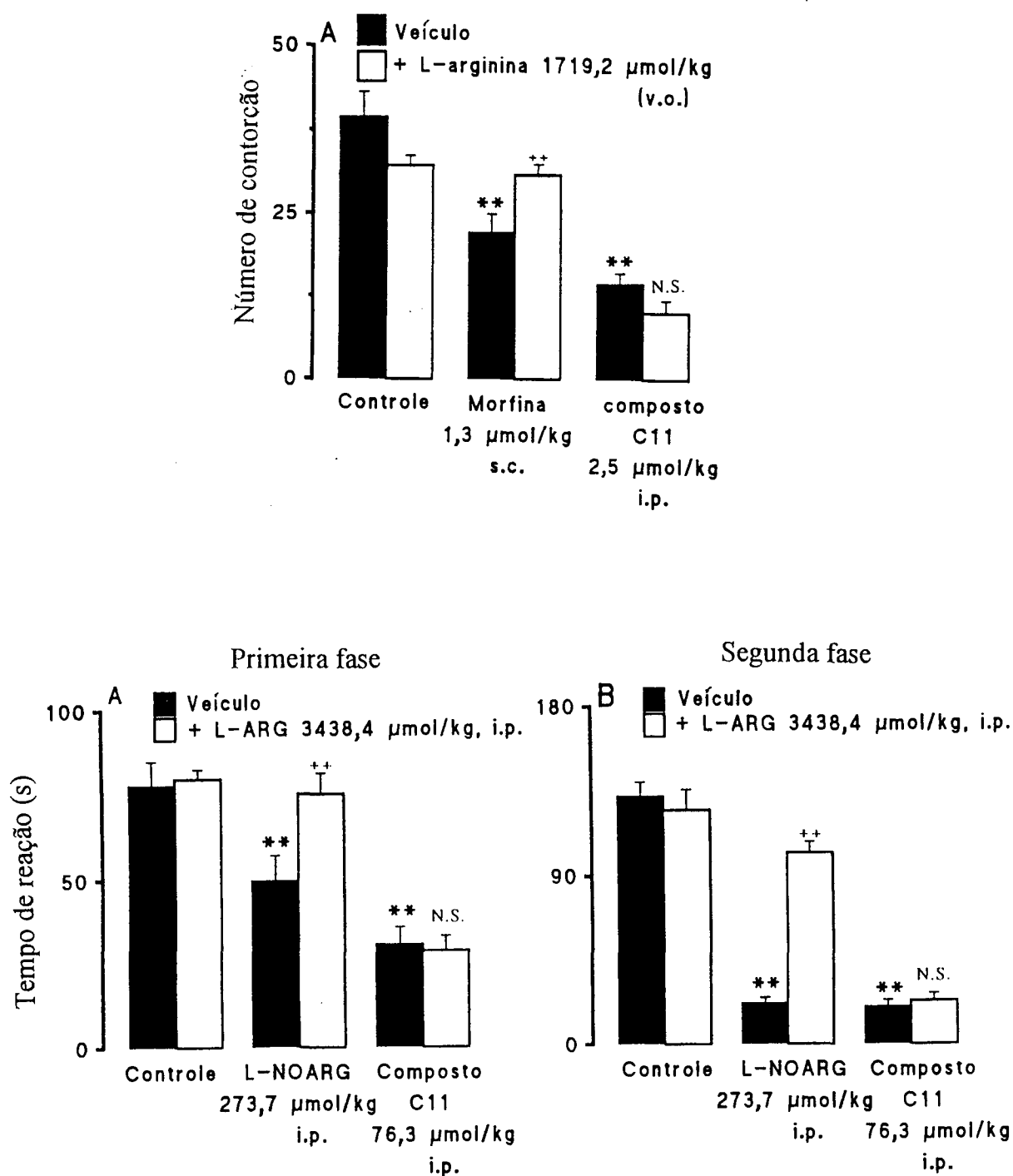


FIGURA 16 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L- ARG sobre a atividade analgésica causada pela morfina ou composto C11 em relação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Painel superior) ou pelo L-NOARG ou composto C11 no modelo da dor induzida pela formalina (Painel inferior) . Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ quando comparado com controle, ++ $P < 0,01$ quando comparado com morfina ou L-NOARG mais veículo e N.S. (não significante) quando comparado C11 mais veículo.

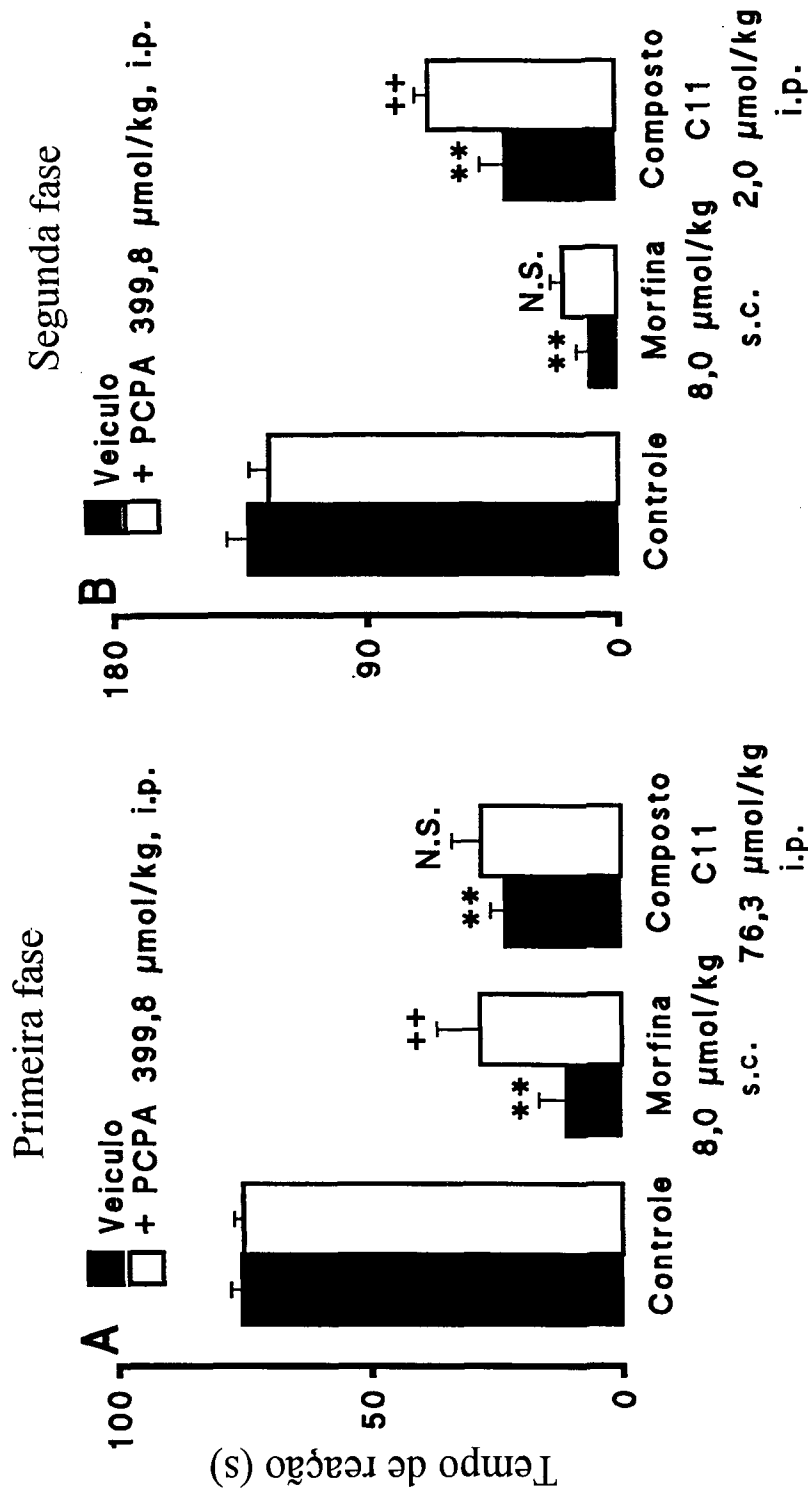


FIGURA 17 - Influência do pré-tratamento em camundongos com DL-p-clorofenilalanina metil ester sobre a atividade analgésica causada pela morfina ou composto C11 em relação à primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. ** P <0,01 quando comparado com controle, ++ P <0,01 quando comparado morfina mais veículo ou composto C11 mais veículo, N.S. (não significativo) quando comparado morfina mais veículo ou composto C11 mais veículo.

Tabela 3 - Efeito antinociceptivo do composto C11 em animais adrenalectomizados no teste da formalina.

| Drogas | Dose ($\mu\text{mol/kg}$, i.p.) | Tempo de reação (s) | |
|--|--------------------------------------|---------------------|-------------------|
| | | 0 - 5 min | 15 - 30 min |
| Falso operado | 0 | 70,0 \pm 4,5 | 113,0 \pm 9,0 |
| Adrenalectomizado | 0 | 74,0 \pm 2,0 | 110,0 \pm 7,0 |
| Composto C11 | 2,5 | 67,0 \pm 6,0* | 62,0 \pm 5,0 ** |
| | 25,4 | 48,0 \pm 5,0** | 14,0 \pm 2,0** |
| | 76,3 | 37,5 \pm 2,0** | 11,0 \pm 0,6** |
| | 152,7 | 23,0 \pm 5,0** | 6,0 \pm 2,0** |
| | 508,9 | 30,0 \pm 2,0** | 13,0 \pm 2,0** |
| DI ₅₀ ($\mu\text{mol/kg}$) (e 95% L.C.) | - | 75,0 (32,0 - 173,0) | 4,0 (3,0 - 7,0) |
| Inibição máxima (%) | - | 69 \pm 5 | 95 \pm 2 |

Cada grupo representa a média \pm erro de 6 animais. * P < .05, ** P < .01 comparado com o grupo controle.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisadas as propriedades antinociceptivas de vários derivados obtidos através de modificações estruturais a partir de dois produtos naturais abundantes, a astilbina e a xantoxilina, obtidas das cascas da Hymeneae martiana (Leguminosae) e das folhas e ramos jovens da Sebastiania schottiana (Euphorbiaceae), respectivamente. Além disso, foi investigado o provável mecanismo de ação antinociceptiva do composto 2-(4-bromobenzoil) -3-metil-4,6-dimetoxi benzofuran (composto C11) derivado da xantoxilina, que apresentou potente ação antinociceptiva em vários modelos de nocicepção.

Os resultados iniciais obtidos no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, um modelo relativamente com pouca especificidade, porém, de fácil observação, mostraram que os derivados tanto da astilbina, denominados compostos C1 e C3, bem como os derivados da xantoxilina, compostos C4, C7, C8, C9, C11 e C12, apresentaram efeito antinociceptivo significativo quando administrados por via intraperitoneal 30 min antes da injeção do ácido acético. Os compostos C3 e C11 derivados da astilbina e da xantoxilina, respectivamente, foram os mais potentes, sendo cerca de 8 a 100 vezes mais ativos que as drogas utilizadas como referência, a aspirina e o acetoaminofeno. Além disso, esses compostos apresentaram ação analgésica de duração relativamente longa (entre 3 - 4 horas).

Com exceção do composto C3, que apresentou atividade analgésica quando administrado por via oral, os demais compostos testados apresentaram fraca atividade antinociceptiva quando administrados oralmente. No entanto, esses compostos foram efetivos quando administrados por via subcutânea.

Um dos aspectos mais interessantes e também relevantes observados no presente estudo foi a observação de que o composto C11, quando administrado pelas vias sistêmica, subplantar, intratecal e i.c.v., apresentou significativa ação analgésica, inibindo tanto a dor de origem neurogênica (primeira fase) como a dor de origem inflamatória (segunda fase) no modelo da formalina, que foi inicialmente descrito por Dubuisson e Dennis (1977) em ratos e gatos. Atualmente esse teste vem sendo amplamente empregado para pesquisa de drogas analgésicas em roedores, principalmente em ratos e camundongos (para revisão ver Tjølsen et al., 1992). Assim, a injeção intraplantar de formalina na pata posterior do animal induziu dor caracterizada por lambidas, mordidas e batidas. Nesse modelo, podem ser caracterizadas duas fases distintas de dor: uma fase inicial que ocorre nos primeiros 5 minutos após a administração de formalina, caracterizada pela estimulação dos nociceptores pelas fibras aferentes do tipo C (Hunskaar et al., 1985; Dubuisson e Dennis, 1977), seguida de uma fase tardia persistente com duração de 20 a 30 min (Hunskaar e Hole, 1987; Malmberg e Yaksh, 1992; Malmberg et al., 1994; Hong e Abbott, 1995). A resposta nociceptiva observada no modelo da formalina está

associada com a liberação de diversos mediadores químicos. A primeira fase (fase neurogênica) está associada com a liberação de substância P, glutamato, bradicinina e adenosina, enquanto que na segunda fase (fase inflamatória), os mediadores químicos detectados foram a histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina e adenosina (Hunskaar e Hole, 1987; Shibata et al., 1989; Corrêa e Calixto, 1993, Corrêa et al., 1996; Reeve e Dickenson, 1995). Nossos resultados mostram que o composto C11 foi cerca de 15 a 100 vezes mais ativo que a aspirina e o acetaminofeno, duas drogas antiinflamatórias não esteróidais conhecidas por inibir apenas a dor de origem inflamatória causada pela formalina (Bjorkman, 1995; Tjølsen et al., 1992; Hunkaar e Hole, 1987 e presente estudo). Por outro lado, o composto C11 foi cerca de 2 a 50 vezes menos potente que a morfina, o mais importante e potente analgésico opióide (Vohora e Dadiya, 1991). Nossos resultados mostram que as ações antinociceptivas desse análogo da xantoxilina estão relacionadas com efeitos a nível espinhal e supraespinhal. Essas observações estão baseadas no fato de que o composto C11, como a morfina, apresentou ação antinociceptiva quando injetado tanto por via sistêmica, intratecal e/ou i.c.v.

Além disso, o composto C11, quando administrado pelas vias sistêmica, tópica e i.c.v., inibiu de forma dose-dependente a dor neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina, uma amida neurotóxica isolada de plantas do gênero Capsium. Recentemente, Sakurada et al (1992; 1993) demonstraram que a

injeção intraplantar de capsaicina em camundongos representa um modelo experimental interessante para o estudo de drogas antinociceptivas, especialmente em relação à dor neurogênica. Vários mediadores químicos foram evidenciados na dor neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina, como as neurocininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B), aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e cininas (Sakurada et al, 1992; Wiertelak et al., 1994; Kregger et al., 1994; Corrêa e Calixto, 1993; Corrêa et al.,1996) . Desta maneira, uma correlação positiva tem sido observada entre as ações antinociceptivas de várias drogas testadas no modelo da dor neurogênica causada pela formalina (primeira fase), com a dor neurogênica causada pela injeção de capsaicina (Santos e Calixto, resultados não publicados). Assim, os resultados obtidos no presente estudo com composto C11, derivado da xantoxilina, abrem importantes perspectivas para o desenvolvimento de novas drogas potencialmente relevantes para o tratamento da dor de origem neurogênica, que permanece até o momento sem uma terapêutica eficaz.

As ações antinociceptivas causadas pelo composto C11 não parecem estar relacionadas com eventuais efeitos antiinflamatórios, uma vez que nas mesmas doses em que o composto mostrou ação antinociceptiva, ele não interferiu com o edema de pata associado com a segunda fase da dor causada pela formalina. Várias evidências experimentais demonstraram que o edema de pata causado pela formalina

envolve a liberação de vários mediadores inflamatórios como as cininas , prostaglandina E2, aminoácidos excitatórios e óxido nítrico (Mamlberg e Yaksh, 1994, 1995; Haley et al., 1990; Yamamoto e Yaksh, 1992; Coderre e Melzack, 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Corrêa et al., 1996). Estudos realizados em nossos laboratórios indicam que o composto C11, administrado sistemicamente apresentou fraca ação sobre o edema de pata, bem como na pleurisia causada pela injeção intratorácica de carragenina em ratos. Além disso, estudos realizados a nível bioquímico (resultados ainda não publicados) revelaram que o composto C11 foi ineficaz em inibir as enzimas cicloxigenase 1 (COX-1) e a cicloxigenase 2 (COX-2) em células COS-7 (em rins de macaco) transfectadas com o cDNA de COX-1 ou de COX-2 humano. Por outro lado, quando o composto C11 foi testado no modelo da dor inflamatória causado pela injeção intraplantar de carragenina em ratos, foi demonstrado que ele inibiu significativamente, embora com menor potência, a hiperalgesia causada pela carragenina.

Com o objetivo de investigar o provável mecanismo de ação antinociceptivo do composto C11 derivado da xantoxilina, foram realizados vários experimentos utilizando-se agonistas e antagonistas seletivos, inibidores enzimáticos em vários modelos experimentais de nocicepção em camundongos. Nossos resultados indicam que o mecanismo preciso de ação do composto C11 derivado da xantoxilina não está ainda completamente esclarecido. No entanto, várias evidências experimentais

obtidas no presente trabalho permitem excluir algumas das principais vias reconhecidamente envolvidas na gênese da nocicepção, especialmente na dor de origem neurogênica, onde o composto C11 foi mais ativo.

Evidências recentes descritas na literatura indicam o envolvimento da via óxido nítrico-L-arginina na modulação da nocicepção (Haley et al., 1992; Snyder, 1992; Yaksh e Rudy, 1977). Assim, Moore et al. (1991) demonstraram que a L-N^G-nitro-arginina metiléster (inibidor seletivo da óxido nítrico sintase), quando administrada sistêmica ou centralmente (i.c.v.), causou importante ação antinociceptiva quando analisada no modelo da formalina. Além disso, os inibidores da síntese do óxido nítrico foram efetivos em antagonizar a hiperalgesia induzida por agonistas de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) que atuam deprimindo a facilitação do reflexo nociceptivo (Verge et al., 1992), ou pela redução da resposta em neurônios dorsais da medula após a estimulação mecânica e térmica (Coderre e Yashpal, 1994; Moore et al., 1991; Yamamoto et al., 1993). Brignola et al. (1994) mostraram que a via da L-arginina-óxido nítrico participa do efeito antinociceptivo da morfina em três diferentes modelos experimentais de nocicepção: a placa-quente, o tail-flick e as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Através da administração prévia com L-arginina por via oral, os autores observaram uma redução do efeito antinociceptivo causado pela morfina. O preciso mecanismo desses efeitos ainda não foi completamente esclarecido mas o tratamento dos

animais com L-arginina pode interferir com a absorção e distribuição dos opióides endógenos, sem interferir com a atividade locomotora ou performance sensomotora dos animais. Da mesma forma, o efeito causado pela L-arginina foi revertido pela pré-administração de dois inibidores competitivos da síntese do óxido nítrico, a L-NMMA (N^G -monometil-L-arginina) ou pela L-NAME (N^G -nitro-L-arginina). Nossos resultados mostraram que o tratamento sistêmico dos animais com L-arginina, um precursor da síntese do óxido nítrico (Moncada et al., 1991), foi eficaz em reverter completamente o efeito antinociceptivo causado pelo L-NOARG (um inibidor do óxido nítrico) em ambas as fases da dor induzida pela formalina. Da mesma forma, a ação analgésica induzida pela morfina foi significativamente revertida pela L-arginina em relação à dor induzida pela injeção de ácido acético em camundongos (Moore et al., 1993; Kawabata et al., 1993; Przewlocka et al., 1994; Brignola et al., 1994). No entanto, nossos resultados indicam que não parece existir envolvimento da via óxido nítrico-L-arginina nas ações antinociceptivas do composto C11 derivado da xantoxilina, uma vez que, o prévio tratamento dos animais com L-arginina não afetou significativamente a antinocicepção causada pelo composto C11 em ambos os modelos de dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, ou em relação às contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético.

Vários trabalhos descritos na literatura sugerem que os agonistas seletivos dos α adrenoceptores, incluindo a fenilefrina e a clonidina, quando administrados sistemicamente, induzem pronunciada ação analgésica em vários modelos de nocicepção (Launeville et al., 1989; Tasker et al., 1992; Bultelma e Woods, 1993; Kawabata et al., 1994). Nossos resultados também confirmam essas observações e demonstram que o tratamento sistêmico dos animais com o antagonista do receptor α_1 adrenérgico, prazosin, em condições em que reverteu o efeito antinociceptivo causado pela fenilefrina (agonista α_1), não alterou significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo composto C11 em ambas as fases da dor induzida pela formalina. Da mesma forma, o antagonista α_2 adrenérgico, ioimbina, não foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo do composto C11 em relação às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (resultados não mostrados). Esses resultados indicam, portanto, que os receptores α_1 e α_2 adrenérgicos não parecem também estar envolvidos no efeito analgésico causado pelo composto C11.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório amplamente distribuído no sistema nervoso central e periférico, identificado em várias espécies animais (Erdo e Bowery, 1986). Resultados descritos na literatura sugerem que os agonistas seletivos para o receptor GABA_B, como o baclofen, apresentam ação analgésica quando testados em vários modelos de nocicepção,

como na contorção abdominal, no teste do tail-flick, na artrite e no teste de pressão na pata. Esse efeito analgésico parece envolver, pelo menos em parte, a redução da transmissão nervosa pelas fibras C ou pela ação nas próprias fibras nervosas junto ao corno dorsal na medula espinhal (Erdo e Bowery, 1986; Lloyd e Morselli, 1987; Malcangio et al., 1991), bem como pela abertura de canais de potássio neuronais (Ocaña e Bae-Yens, 1993). Em nossos experimentos, o antagonista seletivo de GABA_B, faclofen, quando administrado sistemicamente, não foi capaz de modificar significativamente a antinocicepção causada pelo composto C11, em doses suficientes para reverter completamente o efeito analgésico causado pelo agonista seletivo de GABA_B, o baclofen. Estes resultados indicam, portanto, que a ação analgésica do composto C11, ao contrário do baclofen, não depende do sistema GABAérgico tipo GABA_B

Como descrito na introdução, várias evidências experimentais sugerem que o sistema serotoninérgico pode estar envolvido na modulação da nocicepção (Abbott et al., 1986; Barber et al., 1989; Fisher e Bodnar, 1992; Sandrini et al., 1995). O tratamento prévio dos animais durante 4 dias consecutivos com a p-clorofenilalanina metil éster (PCPA), inibidor da síntese de serotonina, foi capaz de antagonizar, embora parcialmente, o efeito analgésico mediado pela morfina (Taber e Lantranyi, 1981; Vonvoigtlander et al., 1984 e presente estudo) ou pelo fenazona, uma droga antiinflamatória não esteroideal (Pini et al., 1993), indicando que seus efeitos

analgésicos parecem estar relacionados, pelo menos em parte, com a interação com os neurônios serotoninérgicos centrais que estão envolvidos na modulação da transmissão da dor. Nossos resultados indicam que o sistema serotoninérgico parece exercer um papel importante sobre o efeito antinociceptivo causado pelo composto C11. Tal fato decorre das observações de que o tratamento dos animais por 4 dias consecutivos com PCPA causou inibição parcial do efeito antinociceptivo induzido pelo composto C11 quando analisado em relação a ambas as fases do modelo da formalina.

Vários estudos têm demonstrado que a morfina e outros agonistas opióides promovem sua atividade antinociceptiva através de receptores específicos (Kappa (κ), μ (μ) e delta (δ)) envolvidos na ação antinociceptiva em sítios localizados a nível espinhal e supraespinhal (Porreca et al., 1986; Hayes et al., 1987; Kanjhan, 1995; Cahill et al., 1995). Hayes et al. (1987) mostraram que a atividade dos agonistas de receptores opióides testados em alguns modelos experimentais térmicos (tail-flick e placa quente), ou químicos (contorções abdominais induzidas pelo ácido acético) ou teste da pressão na pata podem apresentar diferentes efeitos dependendo da espécie animal e do subtipo de receptores (μ , κ e δ), dependendo do modelo utilizado. Nossos resultados indicam claramente que o composto C11 apresenta efeito antinociceptivo espinhal e supraespinhal, mas suas ações analgésicas não

parecem ter interação com o sistema opióide com base nas seguintes observações: primeiro, o prévio tratamento dos animais com naloxona, um antagonista não seletivo opióide, que reverteu quase completamente a antinocicepção produzida pela morfina, não afetou o efeito antinociceptivo produzido pelo composto C11. Segundo, o composto C11 teve muito menos efeito analgésico quando testado nos modelos da placa quente e do tail-flick, que são testes mais sensíveis à morfina e agonistas opióides (Hayes et al., 1987; Conell et al., 1994; Chien e Pasternack, 1994).

Flower et al. (1986) mostraram que a indução de pleurisia pela carragenina em animais adrenalectomizados produziu processo inflamatório mais intenso do que os animais controle (falsos-operados). Os animais adrenalectomizados, apresentaram aumento acentuado da migração celular (aproximadamente o dobro), bem como na quantidade de eicosanóides liberados, tromboxano B2 e leucotrieno B4, quando comparados aos animais falsos-operados (controle). A prévia administração de glicorticóides bloqueou a resposta inflamatória e reduziu a liberação de eicosanóides “in vivo” e “in vitro” em ambos os grupos de ratos. Esses resultados mostraram que a glândula adrenal exerce ação inibitória tônica sobre a resposta inflamatória mediada pela liberação de hormônios e/ou outras substâncias que controlam o desempenho da inflamação. Nossos resultados demonstram que a antinocicepção causada pelo composto C11 não foi modulada significativamente

pelas glândulas adrenais, uma vez que a prévia adrenalectomia dos animais não interferiu significativamente com o efeito antinociceptivo, quando comparado com os animais normais (não adrenalectomizados), quando testados em ambas as fases do modelo da formalina.

A possibilidade das ações antinociceptivas do composto C11 estarem associadas com eventuais efeitos inespecíficos a nível periférico ou central, por comprometimento da atividade motora dos animais foi também avaliada no teste do rota-rod. Nossos resultados mostram claramente que nas doses em que o composto C11 foi efetivo em causar analgesia nos diversos modelos de dor estudados, tanto por via sistêmica como i.c.v., ele não interferiu com a performance dos animais no teste do rota-rod excluindo, dessa forma, a participação de efeitos depressores centrais ou periféricos.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que a partir de modificações estruturais relativamente simples efetuadas em dois produtos naturais abundantes, a astilbina e a xantoxilina isoladas da Hymeneae martiana (Leguminosae) e das folhas e ramos jovens da Sebastiania schottiana (Euphorbiaceae) respectivamente, foi possível produzir compostos com importantes propriedades antinociceptivas. Entre os compostos ativos obtidos, destaca-se o derivado C11 sintetizado a partir da xantoxilina monobromada. Esse composto, além de apresentar bom rendimento no processo de síntese, apresentou potente atividade

antinociceptiva em vários modelos de nocicepção, especialmente em relação à dor de origem neurogênica, tanto nos modelos da formalina como da capsaicina. Esse composto mostrou ação analgésica significativa quando administrado por via sistêmica (intraperitoneal), tópica, intratecal e i.c.v., sugerindo possuir ações tanto a nível espinhal como supraespinhal. Quando testado nos modelos de dor da placa quente e do tail flick, o composto C11 apresentou efeito analgésico, porém foi menos eficaz quando comparado com os resultados obtidos nos modelos de dor neurogênica causado pela formalina e da capsaicina, ou no modelo das contorções abdominais causados pelo ácido acético. O preciso mecanismo pelo qual o composto C11 exerce seus efeitos antinociceptivos não está ainda completamente esclarecido. No entanto, nossos resultados mostram que suas ações antinociceptivas não parecem estar relacionadas com os sistemas opióide, GABAérgico ($GABA_B$) e adrenérgico, com a via L-arginina-NO, nem parece ser modulado pela liberação de substâncias analgésicas nas glândulas supra-renais. No entanto, suas propriedades analgésicas envolvem, pelo menos parcialmente, o sistema serotoninérgico. Além disso, a nocicepção causada pelo composto C11 não parece depender de possíveis efeitos depressores exercidos pelo composto a nível central ou periférico, confirmado pela ausência de efeito no teste do rota-rod.

Assim, novos estudos utilizando técnicas bioquímicas e estudos farmacológicos “in vivo” e “in vitro” deverão ser realizados com o objetivo de

esclarecer o (s) mecanismos envolvidos em suas ações antinociceptivas. Finalmente, nossos resultados mostram também que as modificações estruturais simples introduzidas em produtos naturais abundantes como no caso da astilbina e da xantoxilina, podem resultar no desenvolvimento de substâncias com importantes propriedades antinocicepticas, como o composto C11 (2-(4-bromobenzil)-3-metil-4,6-dimetóxi benzofuran), derivado da xantoxilina. Tal composto, pelas suas importantes ações antinociceptivas evidenciadas nos diversos modelos de nocicepção, pode representar interesse para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas, não opióides, de interesse para o tratamento da dor de origem neurogênica.

SUMMARY

1) In the present study two abundant natural products, astilbin and xanthoxylin in their derivative were analysed in relation to their antinociceptive effects in several models of nociception. Several of the mechanisms involved in the antinociceptive action of the xanthoxyline derivative, called compound C11 (2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran) , which showed potent antinociceptive action, were also investigated.

2) The intraperitoneal injection of the astilbin in mice caused discret but significant analgesic effect in the abdominal constriction produced by acetic acid, but was inactive in the pain caused by formalin. However, some of its derivatives, such as compounds C1 and C3, were about 9 and 2 to 7-fold more potent than aspirin and acetaminophen, the drugs used as positive control when tested in the model of the abdominal constrictions induced by acetic acid and by intraplantar injection of the formalin, respectively.

3) The administration of the xanthoxyline by i.p. route produced slight analgesic effect in the acetic acid-induced writhing, but was inactive in the pain caused by formalin injection. Several of its derivatives, such as the compounds C4, C9 and C12, caused antinociception in the pain induced by acetic acid, being about 2 to 9-

fold more active than standard drugs. Further, the compound C4 showed antinociceptive action against the inflammatory pain caused by formalin, demonstrating twice the activity of standard drugs.

4) The xanthoxylone derivative C11 was the most active compound studied. When administered by systemic (i.p. or s.c., but not p.o.), topical, intracerebroventricular or by intrathecal route, this compound produced potent antinociceptive action in the models of the abdominal constriction caused by acetic acid, in the tail-flick and hot-plate models, in the neurogenic pain caused by formalin and capsaicin, and also in the hyperalgesia caused by intraplantar injection of carrageenin in the Randall-Selitto test. Depending on the model or route of the administration, the compound C11 was about 15 to 100-fold ($\mu\text{mol}/\text{kg}$ or $\mu\text{mol}/\text{site}$) more potent than aspirin and 5 to 50-fold less potent than morphine.

5) The experiments carried out to study the mechanism of action of compound C11 showed that its antinociceptive effects did not involve the opioid system or L-arginine-nitric oxide pathway, nor did it involve interaction with GABAB or the α -adrenergic receptors. Also, its actions were not modulated by adrenal glands. However, the antinociceptive effect of compound C11 was partially, but

significantly, inhibited by treatment of the animals with inhibitor of serotonin synthase. Further, the antinociception caused by compound C11 was not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or other depressive effects at a central or peripheral level, confirmed in the rota-rod test.

6) Taken together, these results show that relatively simple structural modifications to the molecules of astilbin and xanthoxyline, two abundant natural products derived from plants, produced several derivatives with strong antinociceptive properties, with actions at the central and peripheral level. The precise mechanism of antinociception of compound C11 still remain unclear. However, neither selective receptor antagonists for opioids, adrenergic ($\alpha 1$ and $\alpha 2$), GABAB nor the inhibitor of L-arginine-NO-synthase were able to block its antinociceptive action. In addition, the antinociception caused by compound C11 was not modulated by adrenal glands, but depends, at least on the serotonergic pathway. Furthermore, the results showed clearly that the antinociceptive action of the compound C11 was not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or sedation in the animals, both central or the peripheral system. Thus, this study opens up perspectives for the development of new drugs with analgesic potential for the treatment of neurogenic pain.

RESUMO

1 - No presente estudo foram analisados os possíveis efeitos antinociceptivos da astilbina e da xantoxilina, dois produtos naturais abundantes, bem como alguns de seus derivados em vários modelos de nocicepção. Além disso, foram também investigados alguns dos mecanismos envolvidos nas ações antinociceptivas do derivado da xantoxilina, denominado composto C11 (2-(4-bromobenzoil)-3-metil-4,6-dimetóxi benzofuran), que apresentou potente ação antinociceptiva.

2 - A injeção intraperitoneal de astilbina em camundongos causou discreto, porém significativo efeito analgésico no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, mas foi inativa na dor causada pela formalina. No entanto, alguns de seus derivados, como os compostos C1 e C3, foram cerca de 9 e 2-7 vezes mais potentes em causar analgesia que a aspirina e o acetaminofeno, drogas usadas como controle positivo, quando testadas no modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e pela injeção intraplantar de formalina, respectivamente.

3 - A administração da xantoxilina por via i.p. produziu efeito analgésico discreto nas contorções causadas pelo ácido acético, mas foi inativa na dor causada pela formalina. Alguns de seus derivados, como os compostos C4, C9 e C12, causaram antinocicepção na dor induzida pelo ácido acético, sendo cerca de 2 a 9 vezes mais ativo que as drogas-padrão. Além disso, o composto C4 apresentou ação

antinociceptiva contra a dor inflamatória causada pela formalina, sendo 2 vezes mais ativo que as drogas padrão.

4- O derivado da xantoxilina denominado C11 foi o mais ativo dos compostos estudados. Quando administrado por via sistêmica (i.p. ou s.c., mas não oral), por via tópica, intracerebroventricular ou intratecal, esse composto produziu potente ação antinociceptiva no modelo das contorções abdominais causadas pelo ácido acético, nos modelos de dor do tail-flick, placa quente, na dor neurogênica causada pela formalina e capsaicina, bem como na hiperalgesia causada pela injeção intraplantar de carragenina no teste de Randall-Selitto. Dependendo do modelo e da via de administração utilizados, o composto C11 foi cerca de 15 a 100 vezes ($\mu\text{mol}/\text{kg}$ ou $\mu\text{mol}/\text{sítio}$) mais ativo que a aspirina e o acetaminofeno e cerca de 5 a 50 vezes menos ativo que a morfina.

5 - Os experimentos realizados para estudar os possíveis mecanismos de ação do composto C11 revelaram que seus efeitos antinociceptivos não parecem envolver o sistema opióide, a via da L-arginina-óxido nítrico, a interação com os sistemas adrenérgicos ou GABAérgico (GABA_B), ou modulados pelos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais. No entanto, o efeito antinociceptivo do composto C11 foi parcial, mas significativamente inibido pelo tratamento dos animais com inibidor da síntese de serotonina. Além disso, a nocicepção causada pelo composto C11 não

parece depender de possíveis efeitos depressores a nível central ou periférico o que é confirmado pela ausência de efeito no teste do rota-rod.

6 - Em conjunto, esses resultados mostram que modificações estruturais relativamente simples efetuadas nas moléculas da astilbina e da xantoxilina, dois produtos naturais abundantes derivados de plantas, produziram vários derivados com importantes propriedades antinociceptivas, com ações a nível central e periférico. O mecanismo de ação antinociceptivo do composto C11 não está completamente esclarecido, mas não parece envolver os sistemas opióide, adrenérgico, GABAérgico, a via da L-arginina-óxido nítrico ou modulados pelos hormônios das glândulas adrenais. Por outro lado, suas propriedades antinociceptivas dependem, pelo menos em parte, do sistema serotoninérgico. Além disso, os resultados mostram claramente que as ações antinociceptivas do C11 não estão relacionadas com possíveis efeitos depressores central ou periféricamente. Esses estudos abrem, portanto, interessantes perspectivas para o aproveitamento desses compostos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas potencialmente úteis para o tratamento da dor de origem neurogênica, ainda sem uma terapêutica eficaz.

Grande parte desses resultados foi aceita para publicação:

J.Pharmacol. Exp. Ther., 1996, ou submetidos a publicação :

Eur. J.Med. Chemistry., 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; CONNELL, B. The stress of a novel environment formalin pain: possible role of serotonin. **Eur. J. Pharmacol.** 126: 141-144, 1986.
- ADRIAENSEN, H.; GYBEL, J.; HANDWERKER, H.O.; VAN HESS, J. Response properties of thin myelinated (A-delta) fiber in human skin nerves. **J. Neurophysiol.** 49: 111-122, 1983.
- AONONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Phencyclidine selectively blocks a spinal action of N-methyl-D-aspartate in mice. **Neurosci. Lett.**, 67, 191 - 197, 1986.
- BARANIUK, J.N.; KALINER, M.A. Neuropeptides and nasal secretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 86, 620-627, 1990.
- BARBER, A.; HARTING, J.; WOLF, H.P. Antinociceptive effects of the 5-HT₂ antagonist ritanserin in rats: evidence for an activation of descending monoaminergic pathways in the spinal cord. **Neurosci Lett.**, 99: 234-238, 1989.
- BARNES, P.J.; BARANIUK, J.N.; BELVISI, M.G. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 144, 1187-1198, 1991a.
- BARNES, P.J.; BARANIUK, J.N.; BELVISI, M.G. Neuropeptides in the respiratory tract. Part II. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 144, 1391-1399, 1991b.
- BATTAGLIA, G; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol.**, 277: 302-312, 1988.
- BECKE, P.W.; HANDWERKER, H.O. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibres. **Pflugers Arch.** 347: 209-222, 1974.
- BEITEL, R.E; DUBNER, R. Response of unmyelinated (c) polymodal nociceptors to thermal stimuli applied to monkey's face. **J. Neurophysiol.**, 39: 1160-1175, 1976.
- BENEDETTI C.; BUTLER, S.H. Systemic analgesics. In Bonica K. Loeser J.D. CHAPMAN, C.R.; FORDYCE, W.E. ed. The management of Pain. 2nd ed. Philadelphia, London: Lea and Febiger. 2: 1640-1675, 1990.

- BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Br. J. Pharmacol.**, 73: 325-333, 1981.
- BESSOU, P.; PERL, E.R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fiber to noxious stimuli. **J. Neurophysiol.** 32: 1025-1043, 1969.
- BEVAN, S.; YEATS, J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurons. **J. Physiol.** 433: 145-161, 1991.
- BEVAN, S.J.; GEPPETTI, P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. **Trends Neurosc.** 17: 509-512, 1994.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I.F.; RANG, H.P.; SHAH, K.; WALPOLE, C.C.J.; YEATS, J.C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. **Br. J. Pharmacol.** 107: 544-552, 1992.
- BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 39 (103): 1-44, 1995.
- BLEEHAN, T.; KEELE, C.A.. Observations on the algonenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. **Pain.**, (3): 367-377, 1977.
- BONICA, J. anatomic and physiologic basis of nociception and pain In: Bonica K. LOESER, J.D., CHAPMAN, C.R., FORDYCE, W.E. ed. **The Management of Pain.** 2nd ed. Philadelphia, London: Lea and Febiger. 1: 28-94, 1990.
- BRANDÃO, M.L. As bases psicofisiológicas do comportamento. **São Paulo: EPU,** 1991.
- BRIGNOLA, G.; CALIGNANO, A.; DI ROSA, M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 1372-1376, 1994.
- BUTELMAN, E.R.; WOODS, J.H. Effects of clonidine, dexmedetomidine and xylazine on thermal antinociception in rhesus monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 264 (2): 762-769, 1993.

- CALIXTO, J.B.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; RAE, G.A. Action of 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetophenone isolated from *sebastiania schottiana*. **Planta Médica**. 56: 31-35, 1990.
- CALIXTO, J.B.; COELHO, L.; CARNEIRO, E.; YUNES, R.A.; MEDEIROS, Y.S. Análise do extrato hidroalcoólico da *Hymeneae Courbaril* sobre a ação de vários neurotransmissores no útero e íleo de cobaia isolados. **X simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, São Paulo, 1988.
- CALIXTO, J.B.; GOMES, J.C.; CARNEIRO, E.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F.; MEDEIROS, Y.S. Pharmacological evaluation of fractions and two glycosids from the bark of *Hymeneae courbaril* "in vitro". **Brazilian-China Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products**, Rio de Janeiro, p.174, 1989.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; MIGUEL, O.G.; RAE, G.A. Effects of *sebastiania schottiana* on isolated smooth muscle contraction. **Planta Médica**. 52: 444-445, 1986.
- CARILL, C.M.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 275 (1): 84-93, 1995.
- CARNEIRO, E. Identificação de glicosídeos na *Hymeneae martiana*. Estruturas e atividades farmacológicas. **Dissertação de mestrado**, UFSC, Florianópolis, Sc, 211 p. (1989).
- CECHINEL FILHO, V. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais correlação estrutura química - atividade biológica. **Tese de Doutorado**, UFSC, Florianópolis, 1995.
- CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O.G.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antispasmodic activity of xanthoxyline derivatives: structure-activity relationships. **J. Pharmaceutical Sci.** 84: 473-475, 1995.
- CHANG, M.T. Substance P - dopamine relationship in the substantia nigra: a light electron microscopic study of double immunocytochemical labeled materials. **Brain Res.**, 448, 391 - 396, 1988.

- CHIEN, C.C.; PASTERNAK, G.W. Selective antagonism of opioid analgesia by a *sigma* system. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 271 (3): 1583-1590, 1994.
- CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain.**, 52: 259-285, 1993.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Increase pain sensitivity following heat injury involves a central mechanism. **Behav. Brain Res.**, 15: 259-262, 1985.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosci.** 12: 3665-3670, 1992.
- CODERRE, T.J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Pharmacol.**, 6: 1328-1334, 1994.
- COHEN, R.H.; PERL, E.R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **J. Neurophysiol.** 64: 457-464, 1990.
- COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. Classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.** 46: 205-229, 1994.
- COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** 32: 295-310, 1968.
- CONNELL, B.J.; BARNES, J.C.; BLATT, T.; TASKER, R.A.R. Rapid development of tolerance to morphine in the formalin test. **Neuro Report**, 5: 817-820, 1994.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 110: 193-198, 1993.
- CORRÊA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.** (In Press.).

- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol.** 72: 74-79, 1941.
- DEBIASI, S.; RUKSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 7820-7824, 1988.
- DICKENSON, A.H. Central acute pain mechanisms. **Annals of Medicine** 27: 223-227, 1995.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacol**, 26: 1235-1238, 1987a.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post-formalin. **Pain**, 30: 349-360, 1987b.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.** 75: 125-131, 1995.
- DRAY, A. Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. **Bioch. Pharmacol.** 44: 611-615, 1992.
- DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. **Pain review.** 1: 153-171, 1994.
- DRAY, A., PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences.** 16: 99-104, 1993.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of mophine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** 4: 161-174, 1977.
- DUHAM, N.W. ; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** 46: 208-209, 1957.

- DUMUIS, A.; PIN, J.-P.; OOMAGARI, K., SEBBEN, M. & BOCKAERT, J.. Arachidonic acid released from strial neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors. *Nature*, 347: 182 - 184, 1990
- DURCAN, M.J. ; MORGAN, P.F. Intracerebroventricular pertussis toxin enhances sensitivity to N-methyl-D-aspartate-induced seizures in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 197: 209-211, 1991.
- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesic II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107: 385-393, 1953.
- ERDO, S.L.; BOWERY, N.G. Gabaergic mechanisms in the mammalian periphery. Raven Press. New York, 1986.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacol.*, 33: 1479-1485, 1994.
- FISHER, M.C.; BODNAR, R.J. 2-deoxy-d-glucose antinociception and serotonin receptors subtype antagonists: test-specific effects in rats. *Pharmacol. Bioch.* 43: 1241-1246, 1992.
- FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DELA LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norpinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181: 339-345, 1972.
- FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br. J. Pharmacol.* 87: 57-62, 1986.
- GAMMON, C.M.; ALLEN, A.C.C.; MORELL, P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and metabolization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurochem.* 53: 95 - 101, 1989.
- GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S.E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. *Naunyn Schimiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 316: 38-41, 1981.

- GAMSE, R.; MOLNAR, A.; LEMBECK, F. Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. **Life Sci.** 25: 629-636, 1979.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacol.** 31: 251 - 258, 1992.
- GELGOR, L.; CARTMELL, S.; MICHELL, D. Intracerebroventricular micro-injections of non-steroidal anti-inflammatory drugs abolish reperfusion hyperalgesia in the rat's tail. **Pain.** 50: 323-329, 1992.
- GEORGOPOULOS, A.P. Functional properties of primary afferent units probably related to pain mechanisms of primate glabrous skin. **J. Neurophysiol.** 39: 71-84, 1976.
- GEORGOPOULOS, A.P. Stimulus-response relations in high-threshold mechanothermal fibers innervating primate glabrous skin. **Brain Res.** 128: 547-553, 1977.
- GO, V.L.W.; YAKSH, T.L. Release of substance P from the cat spinal cord. **J. Physiol.**, 391: 141-167, 1987.
- GUDERMANN, T.; NÜRNBERG, B.; SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. **J. Mol. Med.** 73: 51-63, 1995.
- HÄBLER, H.J.; JAMG, W.; KOLTEZENBURG, M.. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. **J. Physiol. (Lond.)**, 425, 545 - 562, 1990.
- HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. **Neuropharmacol.**, 31: 51-58, 1992.
- HALEY, J.E.; SULLIVAN, A.F.; DICKENSON, A.H. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. **Brain Res.** 518: 218-226, 1990.
- HALL, J.M.; GEPPETTI, P. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry International.** 26: 17-26, 1995.

- HANDWERKER, H.O. ; REEH, P.W. Nociceptors in animals. Peripheral neurons in nociception: physio-pharmacological aspects. J.M. BESSON, G. GUILBAUD, H. OLLAT. John Libbey Eurotext, Paris © 1994, pp. 1-12.
- HARDY, J.D.; WOOLF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J. Clin. Invest.*, 29: 115-140, 1950.
- HAYES, A.G.; SHEEHAN, M.J.; TYERS, M.B. Differential sensitivity of models of antinociception in the rat, mouse and guinea-pig to μ - and κ -opioid receptor agonists. *Br. J. Pharmacol.* 91: 823-832, 1987.
- HELKE, C.J.; KRAUSE, J.E.; MANTYH, P.W.; COULTURE, R.; BANNON, M.J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptide, receptors and regulatory mechanisms. *FASEP J.*, 4: 1606-1615, 1990.
- HÖKFELT, T.; MILLHORN, D.; SEROOGY, K.; TSURUO, Y.; CECCATELLI, S.; LINDH, B.; MEISTER, B.; MELANER, T.; SCHALLING, M.; BARTFAI, T.; TERENUIS, L. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia.* 43: 768 -780, 1987.
- HONG, Y; ABBOTT, F.V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, 277: 21-28, 1995.
- HOPE, P.J.; JARROT, B.; SHAIBLE, H.G.; CLARKE, R.W.; DUGGAN, A.W. Release and spread of immunoreactive neurokinin A in the cat spinal cord in a model of acute arthritis. *Brain Res.*, 533: 292 - 299, 1990..
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain.*, 25: 125-132, 1986.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, auseful technique for evaluating mild analgesia. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30: 103-114, 1987.
- HYLDEN, J.K.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67: 313-316, 1980.

- ISAKSON, P.; SEUBERT, K.; MASFERRER, J.; SALVEMENI, D.; LEE, L. NEEDLEMAN, P. Discovery of a better aspirin. *Advances in Prostaglandin, Tromboxane, and Leukotriene Research*, vol. 23, edited by B. Samuelsson et al., Raven Press, Ltd., New York©1995.
- JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, 31: 138-151, 1967.
- JOOS, G.F.; GERMONPERÉ, P.R.; KIPS, J.C.; PELEMAN, R.A.; PAUWELS, R.A. Sensory neuropeptides and the human lower airways: Present state and future direction. *Eur. Respir. J.*, 7, 1161-1171, 1994.
- KAGE, R.; MCGREGOR, G. P.; THIM, L.; CONLON, J.M. Neuropeptide g, a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from g proprotachykinin mRNA in the female rat brain. *J. Neurochem.*, 50: 1412-1427, 1988.
- KANAGAWA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATSUDO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 533-540, 1983.
- KANJHAN, R. Opioids and pain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22: 397-403, 1995.
- KAWABATA, A., UMEDA, N. e TAGAGI, H. L-arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-Met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.* 109: 73-79, 1993.
- KAWABATA, A.; KASAMATSU, K.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. The noradrenaline precursor L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine exhibits antinociceptive activity via central α -adrenoceptors in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 111: 503-508, 1994.
- KESSLER, J. A.; BELL, W.O.; BLOCK, I.B. Substance P levels differ in sympathetic target organ terminals and ganglion perikarya. *Brain Res.*, 258: 144-146, 1983.

- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; & MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. **Proc. Jpn. Acad. Series B**, 59: 101-104, 1983.
- KREEGER, J.S.; KITTO, K.F.; LARSON, A.A. Substance P N-terminal metabolites and nitric oxide mediate capsaicin-induced antinociception in the adult mouse. **JPET**. 271: 1281-1285, 1994.
- LANEUVILLE, O.; READERM A.; COUTURE, R. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 159 (3) 273-283, 1989.
- LAURSEN, S.E.; BELKANAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods**. 16: 355-357, 1986.
- LEAH, J.D.; CAMERON, A.A.; SNOW, P.J. Neuropeptides in physiologically identified mammalian sensory neurons. **Neurosc. Lett.** 56: 257 - 262, 1985.
- LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiol. Scand.**, 133: 435-454, 1988.
- LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosc.** 13: 2273-2286, 1993.
- LICO, M.C. Mecanismos de dor e analgesia. Implicações terapêuticas. **Revisão MEDICINA**. 10 (1-2): 11-23, 1979.
- LLOYD, K.G. e MORSELLI, P.L. Psychopharmacology of GABAergic drugs. In psychopharmacology: the third generation of progress, ed. by HERBERT Y. MELTZER, PP. 183-190, Raven press, New York, 1987.
- LUNDBERG, J.M. ; SARIA, A. Polypeptide-containing neurons in airway smooth muscle. **Ann. Rev. Physiol.**, 49: 557-572, 1987.
- MACDERMOTT, A.B.; MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; SMITH, S.J.; BARKER, J.L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. **Nature**, 321: 519 - 522, 1986.

- MAGGI, C. A.; PATACHINI, R.; ROVAIS, P.; GIANCHETTI, A. Review tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists. **J. Auton. Pharmacol.**, 13: 23-93, 1993..
- MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B.E.B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L.L.; SANTIKAN, S. Substance K: A novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: Skrabanek, P. (Ed.) **Substance P**. Dublin: Boole, p.p. 20-21, 1983.
- MALCANGIO, M.; GHERLARDINI, C.; GIOTTI, A., MALMBERG-AIELLO, P. e BARTOLINI, A. CGP 35348, a new GABAB antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect by baclofen. **Br. J. Pharmacol.** 103: 1303-1308, 1991.
- MALMBERG, A.B.; RAFFERTY, M.F.; YAKSH, T.L. Antinociceptive effect of spinally delivered prostaglandin E receptor antagonist in the formalin test on the rat. **Neuroci. Lett.**, 173: 193-196, 1994.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperralgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, 257: 1276-1279, 1992a.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **Brain Res.**, 263: 136-146, 1992b.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain.**, 54: 291-300, 1993.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.** 271: 293-299, 1994.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Effect of continuous intrathecal infusion of ω -conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. **Pain.** 60: 83-90, 1995.
- MELLER, S.T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neurosci.**, 50: 7-10, 1992.

- MELZACK, R. WALL, P.D. The challenge of Pain. New York: Basic Book, 1983.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, 150: 971-979, 1965.
- MIGUEL, O.G. Identificação de compostos Químicos de *Sebastiania Schottiana*. Estrutura e Atividade farmacológica. **Dissertação de Mestrado**, UFSC, Florianópolis, S.C., 1987.
- MITCHELL, A.; AKARASEREENONT, P.; THIERMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R., Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Procee National Academy of Sciences USA**. 90:11693-11697, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pliarmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142, 1991.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 102: 198-202, 1991.
- MOORE, P.K.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.A.; HART, S.L. 7-nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.** 108: 296-297, 1993.
- MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements in the mouse paw formalin test an animal model of tonic pain. **J. Pharmacol. Meth.** 20: 175-186, 1988.
- MYERS, R. D. Neuroactive peptides: unique fases in research on mammalian brain over three decades. **Peptides**, 15: 367-381, 1994.
- NEVES, C.A.; NEVES, P.C.A.; ZANINI, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; CALIXTO, J.B. Analgesic and antiinflammatory activities of the crude hydroalcohlic extract obtained from the bark of *Hymeneae martiana*. **Phytotherapy Res.**, 7: 356-362, 1993.

- NUMAO, T.; AGRAWAL, D.K. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. **J. Immunol.**, 149: 3309-3315, 1992.
- OCAÑA, M.; BAEYENS, J.M. Differential effects of K⁺ channel blockers on antinociception induced by α 2-adrenoceptor, GABAB and K-opioid receptor agonists. **Br. J. Pharmacol.** 110: 1049-1054, 1993.
- OTSUKA, M. ; YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**, 73: 229-308, 1993.
- PAYAN, D. The role of neuropeptides in inflammation. In: Gallin, J.E., Goldstein, I.M., Snyderman, R. (Eds). **Inflammation: Basic Principle and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, p.p. 177-192, 1992.
- PERL, E.R.; KUMUZAWA, T.; LYNN, B. ; KENINS, P. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibres. In: A. Iggo and I. Ilynski (Eds.) **Somatosensory and visceral receptor mechanisms**, Progress in Brain Research, Vol. 43, Elsevier, Amsterdam, p.p. 263-278, 1974.
- PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol Rev.** 35: 85 - 141, 1986.
- PINI, L.A ; VITALE, G.; SANDRINI, M. The role of serotonin brain receptors in the analgesic effect of phenazone. **Drugs Exptl. Clin. Res.** 19: 13-17, 1993.
- PORRECA, F.; MOSBERG, H.I.; OMNAAS, J.R. ; BURKS, T.F.; COWAN. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 240: 890-894, 1986.
- PRZEWLOCKA, B.; MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKI, R. Involvement of the nitric oxide pathway in nociceptive processes in the central nervous system in rats. **Regl. Pept. (supp.1)**: 75-76, 1994.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiol.** 68: 571-590, 1988.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties In: Wall PD, MELZACK, R., Eds. **Textbook of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 57-78.

- REEVE, A.J.; DICKENSON, A.H. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive response of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 2221-2228, 1995.
- ROSLAND, J.H.; HUNKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception tes-dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.** 66: 382-386, 1990.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neurosci.** 31: 1279-1285, 1992.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neuroci. Lett.**, 151: 142-145, 1993.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CUIIRE M.G.; NEEDLEMAN P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 90: 7240-7244, 1993.
- SANDRINI, M.; VITALE, G.; DONDI, M.; PINI, L.A. Effects of acetylsalicyhc acid on serotonin brain receptor subtypes. **Gen. Pharmacol.**, 26: 737-741, 1995.
- SCHAIBLE, H.G. ; JARROTT, B.; HOPE, P.J.; DUGGAN, A.W. (1990) Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat : a study with antibody microprobes. **Brain Res.**, 529: 214-223, 1990.
- SEGUIN, L.; MAROUILLE-GIRARDON, S.L.; MILLAN, M.J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin₁ and neurokinin₂ receptor antagonists: a comparason to other classes of antinociceptive agent. **Pain.**, 61: 325-343, 1995.
- SHERRINGTON, C. The integrative action of the nervous system. N.York, Charles Scribner's Sons, 1906.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H. INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38: 347-352, 1989.

- SHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y.; TOHYAMA, M. Coexistence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**, 425: 256-262, 1987.
- SLILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; BEITZ, A.J.; LARSON, A.A. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. **J. Neurochem.**, 51: 127-132, 1988.
- SMITH, C.H.; BARKER, J.N.W.N.; MORRIS, R.W.; McDONALD, D.M.; LEE, T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J. Immunol.**, 155: 3274-3282, 1993.
- SNYDER, S.H. Nitric oxide: first in the new class of neurotransmitters. **Science**, 257: 494-496, 1992.
- SOLWAY, J.; LEFF, A.R. Sensory neuropeptides and airway function. **J. Appl. Physiol.**, 71: 2077-2087, 1991.
- SORKIN, L.S.; WESTLUND, K.N.; SLUKA, K.A.; DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. **Brain Res. Rev.**, 17: 39-50, 1992.
- SOUTHAN, E.; EAST, S.J.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide: cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. **J. Neurochem.**, 56: 2072 - 2081, 1991.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferotoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sci.**, 47: 1399-1408, 1990b.
- SZOLCSANYI, J.; JANCZO-GABOR, A. Sensory effects of capsaicin congeners. I. relationship between chemical structure and pain-producing potency. **Drug Res.**, 25: 1877-1881, 1975.
- SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: HAKANSON, R.; SUNDLER, F. (Eds.) **Tachykinin Antagonists**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 45-56.

- TABER, R.I. e Lantranyi. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). **Eur. J. Pharmacol.** 75:215-222, 1981.
- TASKER, R.A.R.; CONNELL, B.J.; YOLE, M.J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in formalin test. **Pain.** 49: 383-391, 1992.
- TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J. M.; JORNVALL, M.; MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 128: 947-953, 1985.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.**, 51: 5-17, 1992.
- TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Progress in Neurobiol.**, 38: 397-421, 1992.
- URBAN, L.; DRAY, A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonises the effects of capsaicin in the mouse spinal cord in vitro. **Neurosci Lett.**, 134: 9-11, 1991.
- VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature.**, 367: 215-218, 1994.
- VERGE, V.M.K.; Xu, Z.; Xu, X-J., WIESENFELT-HALLIN, Z., HOKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA.** 89:11617-11621, 1992.
- VOHORA, S.B.; DANDIYA, P.C. Herbal analgesic drugs. **Fitoterapia**, 63: 195-207, 1992.
- VONVOIGTLANDER, P.F.; LEWIS, R.A.; NEFF, G.L. Kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 231: 270-274, 1984.

- WALPOLE, C.S.J.; WRIGGLESWORTH, R. Structural requirements for capsaicin agonists and antagonists. In: Wood, J.N. (ed), capsaicin in the study of pain, pp. 63-82. **Academic Press, New York**, 1993.
- WEI, P.; MOSKOWITZ, M.A.; BOCCALINI, P.; KONTOS, H.A. Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilatation in feline cerebral arterioles. **Circ Res.** 70:1313-1319, 1992.
- WIERTELAK, E.P.; FURNESS, L.E.; HORAN, R.; MARTINEZ, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. **Brain Res.**, 649: 19-26, 1994.
- WILLIAMS, J.T.; ZIEGLGANSBERGER, W. The acute effects of capsaicin on the rat primary afferents and spinal neurones. **Brain Res.**, 253: 125-131, 1987.
- WOMACK, M.D.; MACDERMOTT, A.B; JESSEL, T.M. Substance P increases $[Ca^{2+}]_i$ in dorsal horn neurons via two distinct mechanisms. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 15: 184, 1989.
- WOOLF, C.J. Long term alteration in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. **Pain**, 18: 325-343, 1984.
- YAKSH, T.L.; JESSELL, T.M.; GAMSE, R.; MUDGE, A.W.; LEEMAN, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, 286: 155 - 157, 1980
- YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, 202: 411-428, 1977.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Analg.**, 77: 886-890, 1993.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK-801, an NMDA antagonists, on the formalin test in the rat. **Anesthesiol.** 77: 757-763, 1992b.

YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. II. Excitatory amino acid antagonists. *Pain*. 49: 121-128, 1992a.

YASK, T.L.; RUDY, T.A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 202: 411-428, 1977.