

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

**INDUÇÃO DE EDEMA DE BOCA EM RATOS COMO MODELO DE
DETECÇÃO DE DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS DE AÇÃO LOCAL**

PAULA LADEIRA ORTOLANI

BELO HORIZONTE, AGOSTO DE 2011

PAULA LADEIRA ORTOLANI

**INDUÇÃO DE EDEMA DE BOCA EM RATOS COMO MODELO DE
DETECÇÃO DE DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS DE AÇÃO LOCAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Mestrado Profissional em Inovação Biofarmaceutica da Universidade Federal de Minas Geais, com requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

BELO HORIZONTE, 2011

**“INDUÇÃO DE EDEMA DE BOCA EM RATOS COMO MODELO DE
DETECÇÃO DE DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS DE AÇÃO
LOCAL”**

PAULA LADEIRA ORTOLANI

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 02 de agosto de 2011, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



PROFA. DRA. MARIA ELENA DE LIMA
ICB/UFMG



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE
ICB/UFMG



PROFA. DRA. JANETTI NOGUEIRA DE FRANCISCHI
ICB/UFMG, ORIENTADORA

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2011.

“Se hoje vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton (1642-1727)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a UFMG e a FUNED pela oportunidade em ter desenvolvido o mestrado profissional nesses dois últimos anos.

Às agências de fomento, FAPEMIG (APQ-00541-08), CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

À Janetti, por ter me acolhido em seu laboratório e me mostrado um novo mundo que até então não sabia ao certo como funcionava. Sabendo me acalantar e me educar nos momentos precisos.

À Consuelo, por ter me apoiado em fazer o mestrado, mesmo sabendo que a minha ausência no laboratório poderia comprometer algumas de suas atividades.

À Maria Inácia, por acreditar no meu potencial e me incentivar a fazer o mestrado.

Ao Webster, porque sem ele não teria conseguido fazer nenhum dos experimentos desse trabalho, além de me emprestar um pouco o seu ombro amigo.

À minha família e ao Rafael por estarem sempre ao meu lado me prestando suporte e apoiando independente do meu humor.

Aos amigos da FUNED e do Laboratório de Inflamação e Dor: Ana, Ana Flávia, André, Aristeu, Diego, Francilene, Gena, Lindis, Lutiana, Kelli, Rafael, Rafaella, Rebeca, Tamires, Valéria, Viviane pela amizade e pelas ajudas que não foram poucas.

Aos funcionários do CEBIO, do departamento e laboratórios de Farmacologia, em especial ao Rinaldo.

À todos vocês muito obrigada, pois sem a ajuda de cada um não seria possível a elaboração desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	01
1 INTRODUÇÃO	05
1.1 Inflamação	06
1.1.1 Ácido araquidônico e prostaglandinas	08
1.2 Drogas antiinflamatórias	10
1.2.1 Antiinflamatórios não esteróides	11
1.2.1.1 Substância F	13
1.2.2 Antiinflamatórios esteróides	14
1.3 Modelos experimentais de inflamação e sua importância	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22

4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais	25
4.2 Drogas e sua administração	25
4.3 Edema na pata traseira de ratos	26
4.4 Edema de boca em ratos	27
4.5 Variante do edema de boca	28
4.6 Permeabilidade vascular na pele de ratos, medida pelo extravasamento do corante azul de Evans	29
4.7 Análise do extravasamento do azul de Evans	32
4.8 Análise estatística	32
5.RESULTADOS	33
5.1 Padronização da resposta edematogênica na pata de ratos	34
5.2 Padronização da resposta edematogênica induzida na boca de ratos	36
5.3 Logarítmo da curva dose-resposta na pata e na boca de ratos	39

5.4. Efeito edematogênico da injeção de carragenina (500 µg) administrada por via subcutânea, aplicada externamente à boca	41
5.5 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de boca	43
5.5.1 Indometacina	43
5.5.2 Dexametasona	47
5.5.3 Celecoxibe	50
5.5.4 Ibuprofeno	56
5.6 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata	59
5.6.1 Indometacina	59
5.6.2 Dexametasona	63
5.6.3 Celecoxibe	66
5.6.4 Ibuprofeno	72
5.7 Efeito de drogas antagonistas sobre o edema de boca	75
5.7.1 Maleato de pirlamina	75
5.7.2 Maleato de pizotifeno	79
5.8 Efeito de drogas antagonistas sobre o edema de pata	82

5.8.1 Maleato de pirilamina	82
5.8.2 Maleato de pizotifeno	86
5.9 Utilização do modelo de boca para estudo de novos medicamentos antiinflamatórios	89
5.9.1 Substância F	89
5.9.2 Formulação de ibuprofeno 20%	96
6 DISCUSSÃO	103
7 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXOS	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: COX-1 e COX-2 na síntese de prostaglandinas.

Figura 2: Indução de edema na região oral direita de ratos.

Figura 3: Permeabilidade vascular na pele da boca de ratos medida pelo extravasamento de Azul de Evans.

Figura 4: Leitura de absorbância das soluções de formamida, sob espectrofotometria.

Figura 5: Edema induzido por diferentes doses de carragenina na pata traseira de ratos.

Figura 6: Indução de edema na região oral direita de ratos.

Figura 7: Edema induzido por diferentes doses de carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 8: Curva “log dose-resposta” (edema) obtido de medidas realizadas na terceira hora após a injeção de diferentes doses de carragenina injetada na pata direita de ratos.

Figura 9: Curva “log dose-resposta” (edema) obtido de medidas realizadas na primeira hora após a injeção de diferentes doses de carragenina injetada na região oral direita de ratos.

Figura 10: Edema induzido por carragenina injetada por vias distintas na região oral direita de ratos.

Figura 11: Efeito da indometacina sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 12: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 13: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 14: Efeito da dexametasona sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 15: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 16: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 17: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 18: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 19: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 20: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 21: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 22: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 23: Efeito do ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 24: Efeito de ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 25: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 26: Efeito da indometacina sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 27: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 28: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 29: Efeito da dexametasona sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 30: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 31: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 32: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 33: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 34: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 35: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 36: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 37: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 38: Efeito do ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 39: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 40: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 41: Efeito da pirlamina sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 42: Efeito da pirlamina sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 43: Efeito da pirlamina sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 44: Efeito do pizotifeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 45: Efeito do pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 46: Efeito do pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 47: Efeito da pirlamina sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 48: Efeito da pirlamina sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 49: Efeito da pirlamina sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 50: Efeito da pizotifeno sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 51: Efeito da pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 52: Efeito da pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 53: Efeito da substância F sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 54: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 55: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 56: Efeito da substância F sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 57: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 58: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans 2,5% na terceira hora após a indução de edema com carragenina na pata direita de ratos.

Figura 59: Efeito da formulação de ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 60: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 61: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

Figura 62: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 63: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

Figura 64: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
AA	Ácido araquidônico
ACF	Adjuvante completo de Freund
AINE	Antiinflamatório não esteróide
AM404	N-araquidonoilfenolamina
AUC	Área sobre a curva
C	Controle
CB1	Receptor canabinóide de tipo 1
CEBIO	Centro de bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CG	Carragenina
CGPR	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase

CX	Celecoxibe
Dexa	Dexametasona
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase- Hidrolase de amida de ácidos graxos
FAPEMIG	Fundação de Amparo a Pesquisa em Minas Gerais
Form. Ibu	Formulação de Ibuprofeno a 20%
G	Granulócito
GC	Glicocorticoide
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias por granulócito e macrófago
i.m.	Via Intramuscular
Ibu	Ibuprofeno
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
Indo	Indometacina
INF-γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
n	Número de animais
nm	Nanômetro

NO	Óxido nítrico
°C	Grau Celsius
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
PI₂	Prostaciclina
Piri	Maleato de pirilamina
Plzo	Maleato de pizotifeno
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMN	Granulócito Polimorfonuclear
RvE1	Resolvina E1
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SEM	Erro padrão da média (EPM)
Subst. F	Substância F
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TX	Tromboxano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo experimental de inflamação aguda na cavidade oral de ratos, tendo como padrão de comparação o edema da pata de ratos. A avaliação do edema, medido por um paquímetro, foi realizada em paralelo ao extravasamento do azul de Evans, outro indicador de atividade inflamatória nos tecidos, sob as mesmas condições. A inflamação foi induzida em ratos, machos da raça Holtzman, no lábio superior na porção média do músculo masséter (bochecha) do lado direito por uma injeção subcutânea (na boca), externamente ou internamente (via mucosa oral) de 500 µg de λ-carragenina (CG) e do lado contralateral foi injetado uma solução salina 0,9% no mesmo volume. Como controle, as medições do volume de edema foram realizadas antes da administração do agente flogogênico (0 hora) e após nos tempos ½, 1, 2, 3, 4 e 6 horas. Enquanto que a permeabilidade vascular foi avaliada pelo extravasamento do corante azul de Evans para o espaço intersticial da mucosa oral, em dois tempos, sendo um previamente ao efeito máximo da carragenina (15 min), e no outro no momento em que ocorria o pico do edema (1 hora). Para a avaliação da ação de antiinflamatórios, drogas convencionais de diferentes classes foram administradas, 30 minutos antes o estímulo flogogênico, sendo elas: indometacina (2 mg/kg), ibuprofeno (20 mg/kg) celecoxibe (12 e 30 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg). Todas apresentaram uma redução significativa do edema em relação ao grupo controle. A avaliação de possíveis mediadores inflamatórios também foi realizada através da administração do maleato de pirilanina (10 mg/kg, antagonista do receptor H₁ da histamina) e maleato ácido de pizotifeno (2 mg/kg, antagonista misto da histamina e

serotonina) que por inibir em significativamente a inflamação na primeira hora, confirmaram a ação dos principais mediadores inflamatórios envolvidos no edema de pata traseira e já descritos na literatura. Ao final do trabalho foi possível concluir que o edema de boca responde com a mesma sensibilidade que o edema de pata às drogas antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais, podendo detectar drogas com atividade anti-inflamatória potenciais ainda na primeira hora, sendo dessa forma um modelo mais rápido do que o edema de pata de ratos.

SUMMARY

The present study aimed to develop an experimental model of acute inflammation in oral cavity of rats, it has been considered as a standard of comparison the hind paw edema of the rats. The edema rating was performed in parallel to the extravasation of Evans blue, another indicator of inflammatory activity in tissues with the same conditions. The inflammation was induced in rats, Holtzman male, in the upper lip into the middle portion of the masseter muscle (cheek) on the right by a subcutaneous injection of 500 mg of λ -carrageenan (CG) and the hand side saline solution 0.9% was injected in the same volume. Measurements of the volume of edema was rated before edematogenic agent (0 hour) administration and after in ½, 1, 2, 3, 4 and 6 hours. While vascular permeability was estimated by extravasation of Evans blue onto the interstitial space, occurred on two occasions, with a previously to the maximum effect of carrageenan (15 min), and another occurred at the time of peak edema (1 hour). For the evaluation of anti-inflammatory action, conventional drugs of different types were administered: indomethacin (2 mg / kg), ibuprofen (20 mg / kg), celecoxib (12 and 30 mg / kg) and dexamethasone (1 mg / kg) 30 minutes before stimulation with the CG. All these drugs showed a significant reduction of edema if it was compared with the control group. The rating of possible inflammatory mediators was also achieved through the administration of maleate pyrilamine (10 mg / kg, the antagonist of histamine H₁ receptor) and maleate pizotifen acid (2 mg / kg, mixed antagonist of histamine and serotonin) whose had a significant inhibition of the inflammation in the first hour, confirming the action of the major

mediators involved in the inflammatory edema in the hind paw. At the end of the study, it was possible to conclude that the oral edema responds with the same sensitivity of the hind paw edema to inflammatory drugs, non-steroidal and steroidal, and can detect drugs with potential anti-inflammatory activity even in the first hour, so thus a faster model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A reação inflamatória é uma resposta do organismo à agressão, caracterizada por uma série de eventos complexos no tecido afetado, incluindo vasodilatação arteriolar, seguida de aumento de fluxo sanguíneo e da permeabilidade venular, exsudação plasmática e migração leucocitária para o espaço extravascular. Essas alterações, que ocorrem principalmente na microcirculação, se traduzem nos sinais clássicos da inflamação aguda, descritos como rubor, tumor, calor e dor, decorrentes da ação de produtos biologicamente ativos liberados no local da lesão, denominados mediadores químicos (WEISSMANN, 1992; COTRAN *et al.*, 1999; COLLINS, 2000; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Os mediadores inflamatórios podem ser de origem celular, como a histamina, os eicosanóides, o óxido nítrico, o fator ativador de plaquetas (PAF), as cininas e outras proteínas leucocitárias ou de origem plasmática, como as citocinas e o sistema de complemento (ROCHA e SILVA & GARCIA-LEME, 1972; FERREIRA *et al.*, 1973).

Durante a reação inflamatória ocorre o recrutamento leucocitário para o foco da lesão. O componente celular da reação é representado, principalmente, por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos), que migram da luz dos vasos sanguíneos para os tecidos adjacentes (FLOREY, 1970).

A ação dos mediadores inflamatórios induz além das alterações hemodinâmicas, o aumento da expressão de receptores glicoprotéicos na membrana de leucócitos e na célula endotelial. Estes receptores, denominados moléculas de

adesão, interagem entre si e acarretam o fenômeno de migração leucocitária. Várias famílias de moléculas de adesão, classificadas de acordo com a sua estrutura química foram caracterizadas e dentre essas, três desempenham papel fundamental na interação leucócito-endotélio: as selectinas, expressas em leucócitos circulantes e particularmente, nas células endoteliais, responsáveis principalmente, pelo comportamento "rolling"; e as integrinas e imunoglobulinas, expressas nas células endoteliais e alguns tipos de leucócitos, que contribuem para a aderência e diapedese. A expressão diferenciada das moléculas de adesão nos diferentes estágios do desenvolvimento da reação inflamatória é responsável, em parte, pela seletividade e cinética de migração dos leucócitos para o foco de lesão (GRANGER & KUBES,1994; ALBELDA *et al.*, 1994; RAMPART, 1994; FARSKY & MELLO, 1995).

Os fenômenos de migração leucocitária permitem que o leucócito alcance o foco de lesão para posterior destruição do agente agressor. A eliminação do agente lesivo presente no foco inflamatório ocorre por meio de fagocitose, realizada principalmente pelos neutrófilos e macrófagos. Concomitantemente a esses processos, ocorre um aumento da produção de mediadores inflamatórios e do metabolismo seletivo destas células, resultando na produção de agentes microbicidas (BABIOR *et al.*,1973; BRAUN & FRIDOVICH, 1980). Além deste sistema citotóxico, dependente de oxigênio, os leucócitos liberam o conteúdo de grânulos lisossômicos citoplasmáticos que contém diversas enzimas líticas (COTRAN *et al.*,1999).

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente lesivo seguida pela fase de resolução e reparo, a qual é mediada

principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Se a inflamação aguda falha em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e por linfócitos T, e se o efeito combinado dessas células ainda continua insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas (MEDZHITOV, 2008).

1.1.1 Ácido araquidônico e prostaglandinas

O ácido araquidônico (AA) apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. É um ácido graxo poliinsaturado (4 duplas ligações) de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), a qual pode ser ativada por diversos estímulos como: químico, traumático, térmico, mitogênico, que também ativam citocinas pró-inflamatórias como interleucina -1 (IL-1) (HILÁRIO *et al.*, 2006; KUMMER & COELHO, 2002; BROOKS *et al.*, 1999; DINARELLO, 1996). Ativada a PLA₂, o AA liberado é então metabolizado ou pela via das cicloxigenases, que dá origem à formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PI) e tromboxanas (TXs) ou pela via das lipoxigenases, que leva à síntese dos leucotrienos e lipoxinas (RANG *et al.*, 2007; YEDGAR *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2004).

Na via das cicloxigenases, o ácido araquidônico (Figura 1) é convertido pela enzima cicloxigenase (COX) nos compostos intermediários prostaglandina G₂ (PGG₂) e H₂ (PGH₂), podendo a enzima, ser também denominada de prostaglandina

G/H sintetase. A COX apresenta dois sítios catalíticos: o sítio cicloxigenase e o sítio peroxidase. O primeiro sítio promove a oxidação do AA em PGG₂, que por sua vez é reduzida ao intermediário instável PGH₂ pelo sítio peroxidase (BROOKS *et al.*, 1999). A PGH₂ é convertida pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂ e TXB₂) (KING *et al.*, 2009; HILÁRIO *et al.*, 2006), entretanto, a maioria dos tecidos são capazes de converter PGH₂ em apenas alguns desses produtos finais, dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido. Por exemplo, as plaquetas sangüíneas produzem tromboxana A₂ (TXA₂) e prostaglandina D₂ (PGD₂) e o endotélio vascular produz prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (GERRITSEN, 1996; BUNTING *et al.*, 1983). Com grande diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, as prostaglandinas têm: papel central na inflamação, coagulação sangüínea, angiogênese, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e no desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (MITCHELL & WARNER; 2006; KUMMER & COELHO, 2002; VANE *et al.*, 1998).

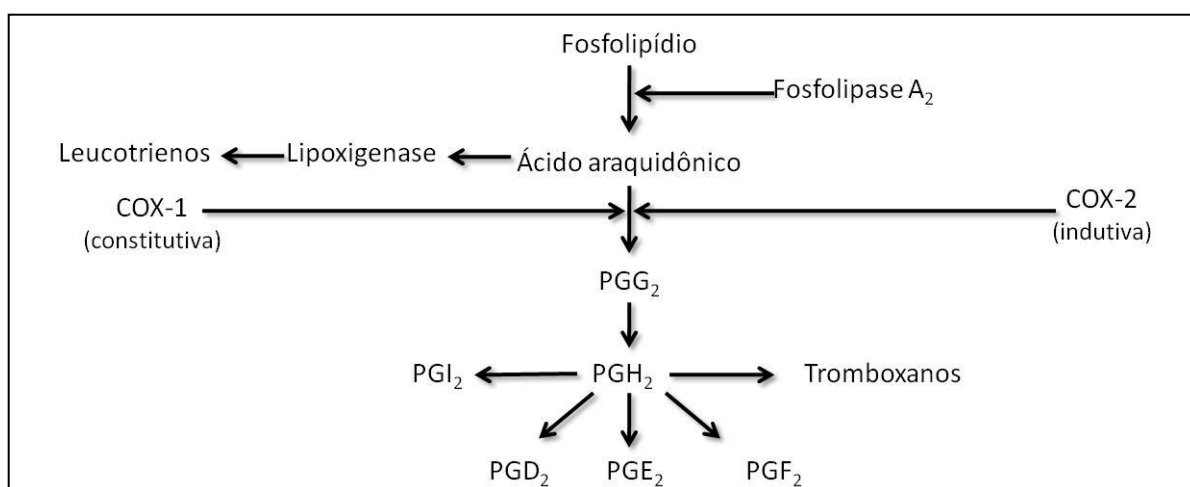


Figura 1: COX-1 e COX-2 na síntese de prostaglandinas. Fonte: BROOKS *et al.*, 1999.

Existem hoje descritas na literatura algumas isoformas de cicloxigenases, que são: a enzima COX-1 presente em quase todos os tecidos, com exceção do eritrócito, sendo chamada de constitutiva e desempenhando funções de homeostase, como citoproteção gastrointestinal, através da síntese fisiológica de prostanóides (KUMMER & COELHO, 2002); a isoforma COX-2, sendo denominada enzima indutível, por ser expressa pela estimulação por citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais, sugerindo a sua relevância no câncer e em processos inflamatórios. Entretanto, hoje já se sabe que essa segunda isoforma também é expressa de maneira constitutiva em alguns órgãos como rins e cérebro (KUMMER & COELHO, 2002; BEICHE *et al.*, 1996; YAMAGATA *et al.*, 1993). Uma terceira isoforma desta família enzimática foi descrita e denominada COX-3, entretanto, por ser tratar de uma variante da COX-1 e derivar do mesmo gene, foi renomeada como COX-1b. Essa nova enzima encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração de cães e humanos (SNIPES *et al.*, 2005; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; WILLOUGHBY *et al.*, 2000). Aparentemente, a isoforma COX-1b parece não ter relevância fisiopatológica na fisiologia humana (KIS *et al.*, 2005; CENSAREK *et al.*, 2006).

1.2 Drogas antiinflamatórias

Antiinflamatórios são fármacos que podem agir em vários passos do processo fisiopatológico, podendo inibir a biossíntese de mediadores pela interação direta com enzimas-chave (como inibição da COX), ou reduzindo as concentrações de

substrato (redução da liberação de ácido araquidônico). Adicionalmente, podem agir inibindo a liberação de mediadores pré-formados (por ex.: histamina), ou antagonizando seus receptores ou ainda, por meio da imunoestimulação (por ex.: maturação de células mielóides ou estimulação de fagocitose), ou removendo a substância irritante e diminuindo a agressão tecidual (SAFAIHY & SAILER, 1997). São duas as classes de antiinflamatórios mais utilizados terapêuticamente: os não esteróides e os esteróides.

1.2.1 Antiinflamatórios não esteróides

Desde 1897, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico, patenteado como “Aspirina”, os agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINE) passaram a ser as drogas mais largamente prescritas e usadas em todo o mundo. Estima-se que, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 50 milhões de pessoas gastam em torno de 5 a 10 bilhões de dólares por ano no consumo destas drogas (CARVALHO *et al.*, 2004; DUBOIS *et al.*, 1998).

Contudo, apesar do largo uso desses agentes, o seu mecanismo de ação foi esclarecido somente em 1971, quando John Vane (VANE, 1971) laureado com o Prêmio Nobel pela sua descoberta, propôs que os antiinflamatórios semelhantes à aspirina suprimem o processo inflamatório pela inibição das ciclooxigenases (COX), impedindo assim a síntese de prostaglandinas.

As COXs, enzimas-chave que catalisam a biossíntese das prostaglandinas, teve duas de suas isoformas descritas apenas em 1991. Apesar das duas isoformas serem expressas por dois genes distintos, as enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e

ciclooxigenase-2 (COX-2) são bastante similares, apresentando 60% de homologia na estrutura protéica primária, além de catalisarem essencialmente a mesma reação (CARVALHO *et al.*, 2004; KULKARNI *et al.*, 2000; VANE *et al.*, 1998; CROFFORD, 1997; KUJUBU *et al.*, 1991; XIE *et al.*, 1991; DEWITT & SMITH, 1988).

Com a descoberta da COX-2, isoforma induzida e expressa predominantemente durante o processo inflamatório, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de drogas antiinflamatórias não-esteróides mais seletivas e com menos efeitos adversos. Os efeitos colaterais gastrintestinais foram atribuídos à inibição da COX-1, enzima constitutiva, e à baixa seletividade de inibição dos fármacos até então usados sobre a COX-2 (CARVALHO, 1999).

A partir de então, originou-se uma nova geração de antiinflamatórios (inibidores seletivos da COX-2), denominados coxibes (FITZGERALD & PATRONO, 2001). Em seguida, foram desenvolvidos os antiinflamatórios não-esteróides superseletivos ou de segunda geração, destacando-se o celecoxibe, rofecoxibe, etoricoxibe, lumiracoxibe, parecoxibe e valdecoxibe (CARVALHO *et al.*, 2004; KULKARNI *et al.*, 2000). Os inibidores seletivos da COX-2, de forma semelhante aos demais AINES, podem promover alterações da função renal, entretanto em 1998, MITCHELL & EVANS relataram que o principal efeito colateral desse grupo de drogas está associado principalmente ao sistema cardiovascular, conferindo também a essa classe de drogas um sucesso limitado, em virtude, principalmente, de seus efeitos colaterais e de suas próprias contra-indicações (CARVALHO *et al.*, 2004).

Devido a grande aplicabilidade dos AINES, desde o tratamento do câncer ao mal de Alzheimer, é grande a busca de novos compostos do mesmo grupo, tornando esse assunto tão atual quanto há 100 anos atrás (CARVALHO *et al.*, 2004).

1.2.1.1 Substância F

Estudos realizados pelo nosso grupo (FRANCISCHI *et al.*, 2002) demonstraram que os inibidores seletivos da COX-2, como por exemplo o celecoxibe, causam hipotalgesia (aumento do limiar nociceptivo acima dos valores normais de nocicepção) e exercem fraco efeito sobre o edema de pata induzido pela carragenina em ratos nas doses hipotalgésicas. Além disso, reduzem a migração leucocitária induzida pela carragenina ou pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) no modelo experimental de inflamação da cavidade peritoneal de ratos (MENEZES *et al.*, 2003). A hipotalgesia causada pelos coxibes no modelo de hiperatalgesia foi associada ao sistema opioidérgico endógeno, visto que foi revertida pela naltrexona, um antagonista opióide não seletivo, e não ocorreu em ratos tolerantes à morfina. (FRANÇA *et al.*, 2006). Nesse trabalho também foi sugerido que tal efeito induzido por esse grupo de drogas ocorre ao nível periférico, ou seja, no local da inflamação.

Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que animais tolerantes à morfina também eram tolerantes ao efeito hipotalgésico do celecoxibe e vice-versa (REZENDE *et al.*, 2010), sugerindo fortemente que o efeito hipotalgésico do celecoxibe poderia ser derivado da liberação de opióides endógenos. De fato, PAIVA-LIMA (2010) mostrou que o celecoxibe, administrado localmente na pata de ratos, provocava a liberação de β -endorfina, da mesma maneira que um agonista canabinóide tipo-2, o composto JWH015, liberação essa que foi revertida em ambos casos (pelo celecoxibe e pelo agonista CB₂), por um antagonista canabinóide (CB₂), o composto SR 144528. Esses dados em conjunto indicaram o envolvimento tanto do sistema opióide como do sistema canabinóide endógeno na hipotalgesia induzida

por celecoxibe o que levou à síntese de um análogo do celecoxibe, substância F, para teste de sua atividade farmacológica em ensaios de inflamação em nosso laboratório, denominado substância F (RESENDE *et al.*, 2010; PAIVA LIMA, 2010).

1.2.2 Antiinflamatórios esteróides

Os antiinflamatórios hormonais são derivados esteróides possuindo um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno (SORRELLS & SAPOISKY, 2007).

Além de sua função hormonal, os glicocorticoides aumentam a transcrição de genes que codificam proteínas antiinflamatórias como a anexina-1, interleucina-10 (IL-10), antagonista do receptor de IL-1 e a endopeptidase neutra (PERRETTI & D'ACQUISTO, 2009; BELVISI *et al.*, 2001), além de inibirem a produção de IL-1, IL-2, IL-3, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α (SNYDER & UNANUE, 1982; ARYA *et al.*, 1984; BEUTLER *et al.*, 1986; SCHIMMER & PARKER, 1996).

As atividades antiinflamatórias e imunossupressoras dos glicocorticóides estão intimamente relacionadas, já que derivam da sua capacidade de inibir funções específicas de leucócito, entre elas a inibição de enzimas lipolíticas (fosfolipase A₂) e proteolíticas, e a liberação de substâncias quimiotáticas, assim como mediadores envolvidos no aumento da permeabilidade vascular, na vasodilatação e na contração de vários músculos lisos não- vasculares (RANG *et al.*, 2007).

1.3 Modelos experimentais de inflamação e sua importância

A inflamação é uma resposta a uma agressão (física, química ou biológica) ao organismo e se caracteriza pela presença de sintomas clássicos que são: rubor (eritema), tumor (edema), calor, dor e/ou perda de função. O processo inicia-se em minutos após a lesão e, pode permanecer por horas ou dias, passando da fase aguda para uma fase crônica, variando de uma fase para a outra os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (CHIANELLI, *et al.*, 1997). Com base nessas manifestações fisiológicas modelos experimentais são desenvolvidos em animais, o que possibilita a análise da atividade biológica de novas drogas antiinflamatórias.

Como os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) agem não apenas como antiinflamatórios, mas também como analgésicos (CARVALHO *et al.*, 2004), os modelos experimentais que possibilitam avaliar a sensibilização e a ativação dos nociceptores, através da avaliação da dor e/ou reação comportamental do animal pode ser utilizados na análise de novas drogas com potencial antiinflamatório. Entre eles, estão por exemplo: o teste de estímulo mecânico (pressão) na pata do rato, de acordo com o método descrito por RANDALL & SELLITO (1957), método esse, empregado como modelo para avaliar hiperalgesia, que é caracterizada pela diminuição do limiar de sensibilidade dolorosa. Além disso, por essas características, tal modelo é freqüentemente utilizado para o estudo de fármacos com atividade antiinflamatória e/ou analgésica periférica. E o modelo das contorções abdominais consiste em administrar ácido acético PA. via intraperitoneal e contar a resposta

reflexa motoras decorrentes dessa aplicação. Nesse modelo é possível avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico, sendo dessa forma um teste pouco específico (KOSTER *et al.*, 1959).

Alguns modelos experimentais consistem na indução de uma resposta inflamatória aguda e/ou crônica, de forma que possibilitam a identificação de múltiplos mediadores e células que têm papel importante na indução de vários sinais e sintomas associados (COLLINS, 2000).

Dentre os ensaios que induzem inflamação, os modelos clássicos são: o modelo de edema de patas, no qual um agente flogogênico é administrado no tecido subcutâneo da pata de ratos ou camundongos que induz a formação de uma inflamação aguda, gerando alteração da espessura ou do volume da região trabalhada (DI ROSA, 1972). Outro ensaio é a indução de artrite por, por exemplo, Adjuvante Completo de Freund (ACF) que propicia o desenvolvimento de uma inflamação crônica nas articulações (FERREIRA *et al.*, 2001; SUZUMURA *et al.*; 1989). Há o modelo de indução de febre (COELHO *et al.*, 1992), no qual a administração intravenosa ou intracerebroventricular de LPS (lipopolissacarídeo) ou endotoxina bacteriana, componente isolado da parede de bactérias gram-negativas (RIETSCHER *et al.*, 1994), é capaz de induzir uma resposta febril nos animais manipulados, dentre outros modelos mais.

Os modelos *in vivo* permitem ao pesquisador obter uma visão global dos efeitos da droga estudada na espécie animal estudada. Através destas análises torna-se possível prever se um antiinflamatório apresenta atividade analgésica,

antiinflamatória e/ou antipirética. Permitem também, determinar uma relação dose-efeito da droga e prever posologia em humanos, como é o caso dos AINEs no modelo de edema induzido pela carragenina nas patas traseiras de ratos (MUKHERJEE *et al.*, 1996; GIRAUDEL *et al.*, 2005).

Apesar dessa gama de ensaios *in vivo* disponíveis hoje no meio científico são poucos os modelos de inflamação aguda desenvolvidos na cavidade oral. Dentre os ensaios pré-clínicos encontrados, destacam-se: o modelo de doença periodontal por ligadura (SALLAY *et al.*, 1982), que gera uma inflamação crônica na região cervical do segundo molar superior ou da articulação temporomandibular; o modelo de inflamação induzido pela carragenina na articulação temporomandibular, que visa estudar o limiar de dor do animal (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009); e o único modelo para uma avaliação de inflamação aguda encontrado foi o modelo de edema na língua em camundongo, no qual a administração tópica de um agente flogogênico na língua proporciona um edema agudo que pode ser mensurado com auxílio de um paquímetro (DIP *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A pele e, especialmente, as mucosas têm sido freqüentemente utilizadas como via de administração de fármacos, sendo extremamente atrativas não apenas pelo seu efeito local, mas também para obtenção de efeito sistêmico, como no caso das drogas antiinflamatórias, pela sua ausência do metabolismo de primeira passagem (PRAUSNITZ, 2004; HENRIQUES et al., 2007). Dessa forma, formulações tópicas bucais vêm sendo largamente utilizadas no tratamento de inúmeras patologias da cavidade oral como a gengivite, a periodontite, a estomatite, as ulcerações orais dentre outras mais. Entretanto, a avaliação dessas formulações em vários aspectos, como a sua absorção cutânea, efeito e o tempo de permanência nos tecidos são realizados em ensaios *in vitro*, que não permitem presumir os efeitos que poderiam ocorrer em um animal. Em buscas realizadas na literatura, inúmeras análises da eficiência dos novos mucoadesivos podem ser encontradas, porém, o único ensaio relacionado à absorção *in vivo* na fase pré-clínica é desenvolvido na mucosa oral intacta de coelhos, sendo esse muitas vezes substituído por ensaios *in vitro* ou *ex vivo* (MURA et al., 2010; BASU et al., 2010; SIEGEL et al., 1981).

Além disso, outro fator que nos chamou atenção para o desenvolvimento de um modelo *in vivo* de edema na região oral foi que trabalhos realizados recentemente em nosso laboratório demonstraram a ação local de drogas antiinflamatórias no modelo de doença periodontal, um tipo de inflamação crônica na cavidade oral, com diminuição tanto dos neutrófilos quanto da mieloperoxidase no tecido gengival dos animais. Constatou-se nesse modelo, que a administração de morfina restringiu as perdas ósseas e do tecido de inserção periodontal, freqüentes em quadro de doença periodontal, sem afetar o número de células que migraram para o sítio inflamado, o que poderia ser uma estratégia para modular a resposta

inflamatória local (PACHECO et al., 2007; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009). Esses resultados nos levaram a questionar se a aplicação local de drogas antiinflamatórias de mecanismo de ação conhecido poderiam, também afetar um modelo de inflamação aguda.

Diante dessas indagações sobre possíveis diferenças do processo inflamatório na região oral e outras regiões do corpo, bem como a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos tópicos, surgiu a necessidade de se estabelecer um modelo de inflamação aguda adequado que proporcionasse uma melhor compreensão do processo inflamatório, e que favorecesse melhor dosagem de drogas que pudessem ser administradas, localmente na cavidade oral de ratos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver nova metodologia de inflamação aguda na cavidade oral de ratos, tendo como padrão de comparação o edema da pata de ratos. A avaliação do edema foi realizada em paralelo ao extravasamento do azul de Evans, outro indicador de atividade inflamatória nos tecidos, sob as mesmas condições experimentais.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir edema pela carragenina na boca e pata de ratos;
- Construir curvas dose-resposta de edema (de boca e de pata de ratos) à carragenina;
- Avaliar a eficácia de substâncias anti-inflamatórias da classe AINES não- seletivas (indometacina e ibuprofeno) e seletivas (celecoxibe) bem como a dexametasona um antiinflamatório esteróide, no edema induzido pela carragenina;
- Comparar a formação do edema de boca e de pata com o extravasamento do azul de Evans nesses sítios;
- Verificar a eficácia de substâncias anti-inflamatórias não esteroidais e da dexametasona no extravazamento do azul de Evans;
- Avaliar a participação de mediadores inflamatórios, histamina e serotonina, utilizando as drogas: maleato de pirilamina e maleato ácido de pizotifeno, envolvidos na resposta inflamatória à carragenina na boca;

- Verificar o efeito de substâncias anti-inflamatórias potenciais, desenvolvidas pelo grupo de pesquisa, e protegidas por sigilo para futuro patenteamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Holtzman pesando entre 130 e 200 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG).

O projeto, contendo a metodologia prevista para o desenvolvimento deste trabalho, protocolo número 118/09, foi aprovado em 09/09/2009 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), vide anexo.

4.2 Drogas e sua administração

Todos os procedimentos para a indução de edema no novo modelo experimental, bem como a indução do extravasamento foram realizados sob anestesia geral, utilizando-se uma mistura de ketamina 10% (Dopalen[®]) e xilazina 2,3% (Anasedan[®]), nas doses 90 e 15 mg/kg, respectivamente (0,1ml/100g), administrada por via intramuscular (i.m.).

O agente edematogênico utilizado foi a carragenina λ (Sigma) preparada pelo menos uma semana antes do experimento (OTTERNESS & MOORE, 1988) e administrado sempre por via subcutânea, na boca ou intraplantarmente (ver adiante), em volume de 0,1 ml, no tempo denominado “tempo zero”. Animais controle receberam o mesmo volume de salina nos mesmos sítios no tempo zero. Para realizar a curva dose resposta, a carragenina foi preparada nas seguintes concentrações: 0,25, 2,5, 5 e 10 mg/ml em solução salina estéril (0,9%). Após obtenção das curvas dose-resposta, selecionou-se a concentração de 5 mg/ml de carragenina para uso nos experimentos subseqüentes.

Os antiinflamatórios de diferentes grupos farmacológicos foram administrados sistemicamente ½ h antes da injeção de carragenina, e avaliados nos dois modelos experimentais: o antiinflamatório esteróide dexametasona (1 mg/kg); dois não esteróides (AINEs) tradicionais, não seletivos para as ciclooxigenases (COXs): a indometacina (2 mg/kg) e o ibuprofeno (20 mg/kg); um inibidor seletivo para a COX-2: o celecoxibe (12 e 30 mg/kg) e a substância F (12 mg/kg), que é o novo composto a ser estudado. Também foram utilizados o antagonista do receptor H₁ da histamina, maleato de pirlamina (10 mg/kg) e o maleato ácido de pizotifeno (2 mg/kg), um antagonista misto de receptores da serotonina (5-HT₂) e de histamina (H₁) (HOYER *et al.*, 1994; FRANCISCHI *et al.*, 1996). Todas as drogas descritas foram administradas subcutaneamente (sc) no dorso da região cervical do animal, 30 minutos antes da injeção de carragenina.

Uma formulação adesiva contendo ibuprofeno, desenvolvida para ser estudada na cavidade oral, foi sintetizada pelo professor Dr. André Faraco da Faculdade de Farmácia na UFMG, e preparada de maneira a conter a droga na concentração 20%. Para melhor aderência da formulação à mucosa oral, o adesivo foi umedecido com solução salina estéril 0,9% e pressionado com o auxílio de uma pinça. Além disso, as patas traseiras onde foram aplicados os adesivos foram envolvidas com fita crepe, para garantir um maior tempo de contato do adesivo com a região edemaciada.

4.3 Edema na pata traseira de ratos

Inicialmente, foram determinadas as espessuras das patas esquerda e direita (direção dorso-ventral) de todos os animais, antes de qualquer injeção. As espessuras (em

mm) foram obtidas com o uso de um paquímetro digital (Absolute- Série 500 da Mitutoyo, Japan).

Em seguida, o edema foi induzido por carragenina injetada na região intraplantar da pata posterior direita, enquanto na pata esquerda foi injetada solução salina estéril 0,9%, sempre em total de 0,1 ml (OTTERNESS & MOORE, 1988).

Após a injeção de carragenina, as espessuras das patas foram também medidas nos tempos ½, 1, 2, 3, 4 e 6 horas. Os resultados foram expressos pela média da diferença (pata direita - pata esquerda) da espessura \pm erro padrão da média (SEM).

4.4 Edema de boca em ratos

Inicialmente, após anestésiar o animal, foi mensurada a espessura do lábio superior na porção média do músculo masséter (bochecha, em mm); esse músculo se estende do arco zigomático à face lateral do ramo da mandíbula (ver figura 2), introduzindo-se o paquímetro na boca antes de qualquer injeção (tempo zero), tanto do lado direito quanto esquerdo dos animais.

Com o animal ainda anestesiado e em decúbito dorsal, a agulha (BD PrecisionGlide 0,30x13 30G, 1/2) era posicionada na borda lateral do lábio superior, conforme indicado na Figura 2, fazendo-se a inserção através da mucosa oral no tecido subcutâneo adjacente na porção mais espessa do músculo masséter, de maneira a propiciar a formação do edema entre a mucosa oral e a superfície externa da boca, bochecha (Fig. 2). Em seguida, fazia-se a administração ou de salina, no lado esquerdo, ou de carragenina, no lado direito. Após a injeção, a espessura da bochecha era também medida nos tempos ½, 1, 2, 3, 4 e 6 horas.

Os resultados foram expressos pela média da diferença (região direita - região esquerda) da espessura (mm) \pm erro padrão da média (SEM) em cada grupo de animais.

O edema de boca sempre foi realizado em paralelo à indução do edema de pata, com igual número de animais por grupo. Dessa forma, os dois modelos experimentais puderam ser comparados sob as mesmas condições experimentais.



Figura 2: Indução de edema na região oral direita de ratos. Ratos Holtzman após serem anestesiados receberam, através da mucosa oral, injeção de carragenina no lado direito e de solução salina estéril no lado esquerdo, no volume total de 0,1ml/região. A avaliação do edema formado em cada animal foi realizada pela diferença entre as medidas de espessura do lado direito pelo esquerdo (em mm), indicadas pelas linhas vermelhas em A e B, respectivamente.

4.5 Variante do edema de boca

Antes de se escolher a metodologia definitiva para se estudar o edema de boca, outra região foi também utilizada. Nessa nova região da boca, localizada mais para o meio da bochecha do rato, a agulha foi introduzida pelo lado externo da boca, perpendicularmente à face, no tecido subcutâneo. A administração de carragenina em dose única, ou de solução salina, dependendo do lado, foi executada conforme descrito anteriormente, e esse momento, também foi considerado o tempo zero. Medidas subseqüentes da espessura da bochecha, nos mesmos tempos já indicados, foram obtidas com o paquímetro, fazendo-se a diferenças entre os dois lados e encontrando-se a média \pm epm para os diferentes tempos experimentais.

4.6 Permeabilidade vascular na pele de ratos, medida pelo extravasamento do corante azul de Evans

Após anestesia dos animais, o corante Azul de Evans 2,5% diluído em salina fisiológica estéril foi administrado por via intravenosa, no plexo venoso peniano, em um volume de 0,1ml/100 g de peso (ROCHA E SILVA & GARCIA LEME, 1972).

Posteriormente, os animais foram divididos em dois grupos, para receber as injeções intraplantares ou intra-orais. A administração da carragenina, na concentração 5 mg/ml, foi realizada sempre do lado direito do animal enquanto do lado esquerdo era administrada a solução salina estéril 0,9%, em um volume total de 0,1ml/região (Figura 3).



Figura 3: Permeabilidade vascular na pele da boca de ratos medida pelo extravasamento de Azul de Evans. Administração de Azul de Evans 2,5% por via intravenosa no plexo peniano de ratos Holtzman, seguida pela indução de edema na região oral. No lado direito foi administrado 500 µg de carragenina e no lado esquerdo solução salina estéril, num volume de 0,1 ml/sítio.

Após a administração do estímulo (carragenina ou salina) na mucosa oral, os animais eram sacrificados em dois tempos diferentes, sendo um dos tempos anterior ao efeito máximo da carragenina (15 min) e o outro no momento em que ocorria o pico do edema (1 hora). Os animais que tiveram a indução de edema nas patas foram novamente divididos em dois grupos, sendo que um foi sacrificado após trinta minutos e o outro após a terceira hora da indução do edema pelo agente flogogênico. Todos os animais estudados foram sacrificados respeitando-se as normas éticas, que dessa forma, ocorreu em câmara de dióxido de carbono (CO₂).

Imediatamente após o sacrifício dos animais, fragmentos das regiões internas da bochecha (mucosa oral) injetadas com salina ou carragenina foram recortados, pesados, sendo posteriormente fragmentados em pedaços ainda menores e imersos em 3 ml de formamida PA, previamente adicionada em tubos de ensaio. Para a extração do corante, os tubos foram deixados sob agitação intermitente por 12 horas a 37°C. Em seguida, o material foi centrifugado e a absorvância do sobrenadante foi lida em comprimento de onda de 623 nanômetros por espectrometria (Figura 4).



Figura 4: Leitura de absorvância das soluções de formamida, sob espectrofotometria.

A solução de formamida mais corada de azul, no tubo da direita (*), provavelmente reflete maior presença/quantidade do corante nos fragmentos do que nos fragmentos do tubo à esquerda.

4.7 Análise do extravasamento do azul de Evans

Para se conhecer o total de corante extravasado nos tecidos submetidos às diferentes condições experimentais, foi obtida uma curva de absorbância em relação às soluções de azul de Evans com concentração previamente conhecida, e também lidas no espectrofotômetro em $\lambda = 623 \text{ nm}$. Desse modo, foi obtida a equação da reta que permitiu a determinação do corante extravasado.

Com base nessa equação substituíam-se o valor da leitura da amostra pelo valor de y (absorbância), possibilitando-se obter o valor de x (quantidade) de corante no tecido. Para normalizar os dados, e dessa forma reduzir as variações de extravasamento devido ao tamanho dos fragmentos, dividia-se a quantidade do corante extravasado (em μg) pelo peso (em mg) do tecido.

Os resultados foram expressos pela média da diferença (região direita - região esquerda) da quantidade de azul de Evans ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) \pm erro padrão da média (SEM).

4.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (SEM) de cada grupo experimental, sendo comparadas, primeiramente, as diferenças entre as médias obtidas de animais controle e de animais injetados com carragenina, e posteriormente, dos animais injetados com as diferentes drogas e os animais injetados apenas com o veículo das mesmas (+CG). Para análise estatística foi utilizado o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste Bonferroni (*post hoc*) e foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da resposta edematogênica na pata de ratos

Inicialmente, foi estabelecido o padrão de resposta edematogênica à carragenina na pata de ratos, para que os objetivos do presente trabalho fossem alcançados. A Figura 5, a seguir, apresenta tais resultados. Como pode ser observado nessa figura, a carragenina nas doses de 25, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{pata}$ induziu edema de maneira dose-dependente nos animais de experimentação. Também se observa na mesma (Figura 5) que o pico do efeito edematogênico ocorreu significativamente na terceira hora e permaneceu aumentado em relação aos animais controle (salina na zero hora) até a sexta hora de observação.

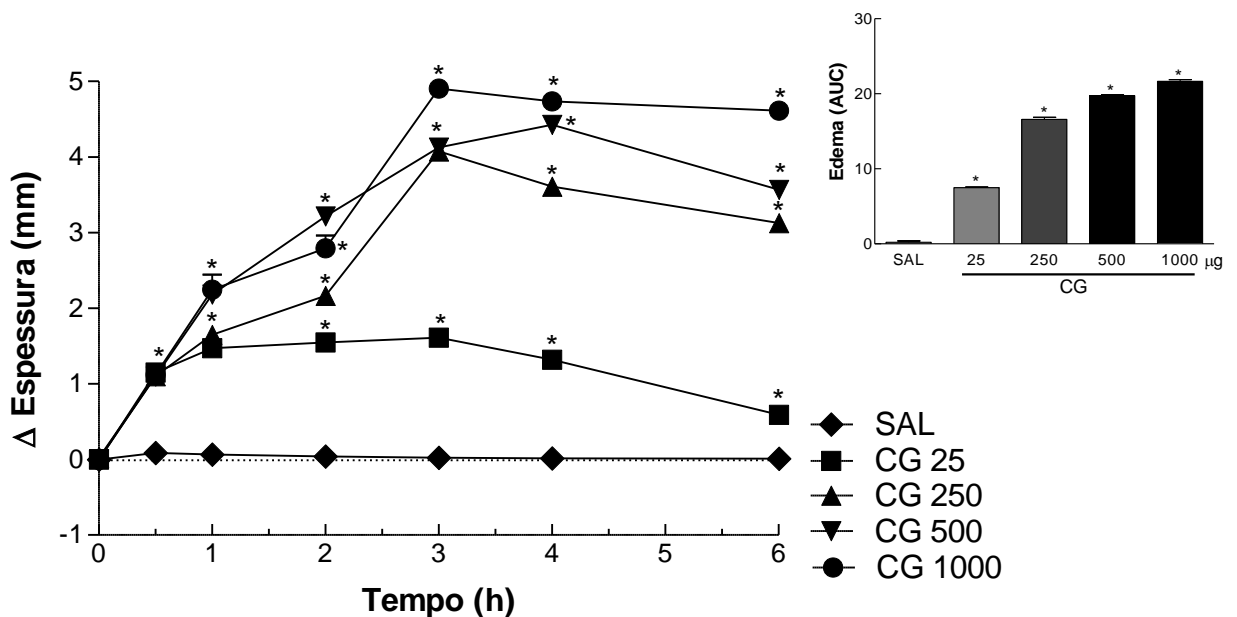


Figura 5: Edema induzido por diferentes doses de carragenina na pata traseira de ratos. Carragenina (CG 25, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) e salina fisiológica estéril (100 μl) foram injetadas nas patas posteriores direita e esquerda, respectivamente. Os dados são apresentados como a média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente

significativa em relação ao grupo salina ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 3-5$. O inserto a direita mostra a mesma resposta edematogênica na pata, expressa como área sob a curva (AUC).

5.2 Padronização da resposta edematogênica induzida na boca de ratos

Em paralelo à padronização do edema de pata, foi elaborada a padronização da resposta edematogênica às mesmas doses de carragenina (25, 250, 500 e 1000 µg) injetadas na boca dos animais. O posicionamento da agulha para a injeção na boca se encontra ilustrado na Figura 6.

Independentemente da quantidade do agente edematogênico administrado, a boca atingia a sua espessura máxima na primeira hora de injeção. A partir de 1 hora da injeção de carragenina (CG) a resposta edematogênica, como com a maioria das doses utilizadas (25 a 500 µg/boca), teve diminuição crescente de seus valores, sendo que após 6 horas das injeções, chegou a 50% do efeito máximo observado (Figura 7). Entretanto, com a maior dose de CG utilizada (1000 µg/boca) observou-se a permanência do efeito edematogênico até a 4ª hora da injeção, quando iniciou-se o processo de reversão da resposta.



Figura 6: Indução de edema na região oral direita de rato. Os animais, após serem anestesiados, receberam através da mucosa oral, injeção de carragenina no lado direito e de solução salina estéril no lado esquerdo, no volume total de 0,1 ml/região. No momento da administração a agulha era posicionada de forma paralela ao músculo masseter em sua porção mais estreita e penetrando na região mais espessa do mesmo pela face mucosa da cavidade oral. A avaliação do edema formado foi realizada pela diferença das medidas do lado direito pelo esquerdo (em mm).

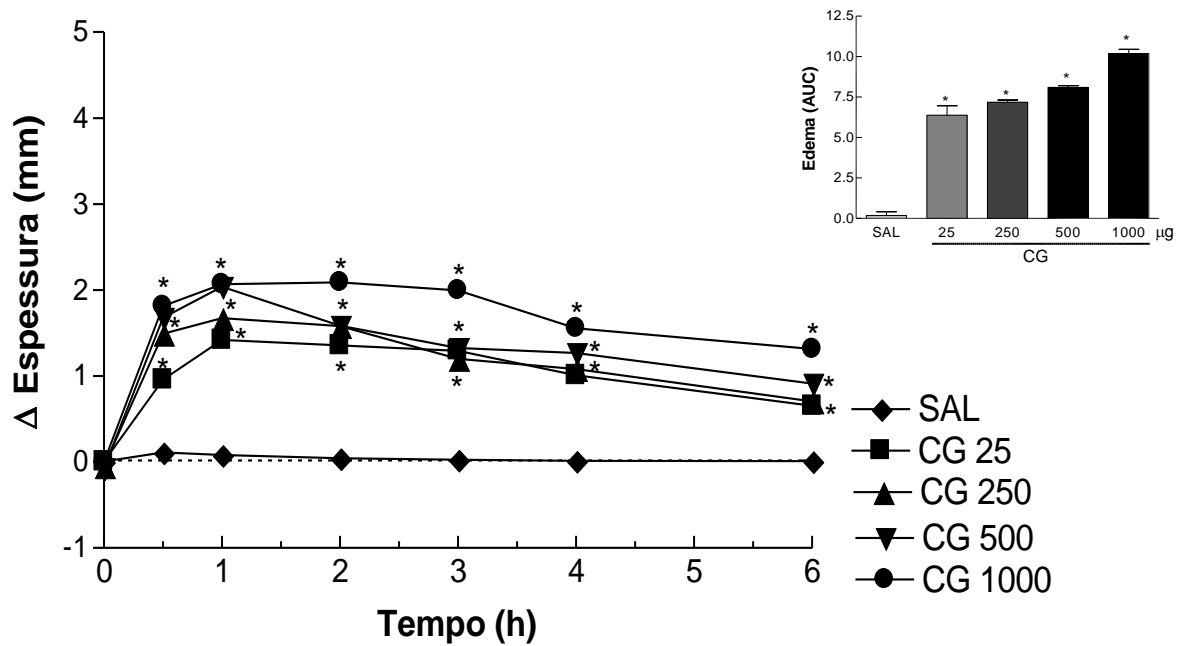


Figura 7: Edema induzido por diferentes doses de carragenina na região oral direita de ratos. Carragenina (CG 25, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) e salina fisiológica estéril (SAL 100 μl) foram injetados na região oral direita e esquerda, respectivamente. Os dados são apresentados como a média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 3-5$. O inserto a direita, mostra a mesma resposta edematogênica na região oral expressa como área sob a curva (AUC).

5.3 Logarítimo da curva dose-resposta na pata e na boca de ratos

Após a análise das figuras anteriores, foi elaborada a curva “log dose-resposta” utilizando apenas as medições no momento em que houve uma maior expansão da espessura, no caso da pata às 3 horas da injeção e no caso da boca à 1 hora da injeção. Conforme observado na Figura 8, observa-se uma inclinação de 19,72 da reta para as patas traseiras na terceira hora, enquanto para a região oral (Figura 9) na primeira hora após a injeção a inclinação obtida foi de 4,3.

A partir da avaliação da curva “log dose-resposta” na região oral, estabeleceu-se que a melhor dose a ser utilizada na região é 500 µg de carragenina. Essa dose ficou definida, para ser utilizada nos experimentos subseqüentes.

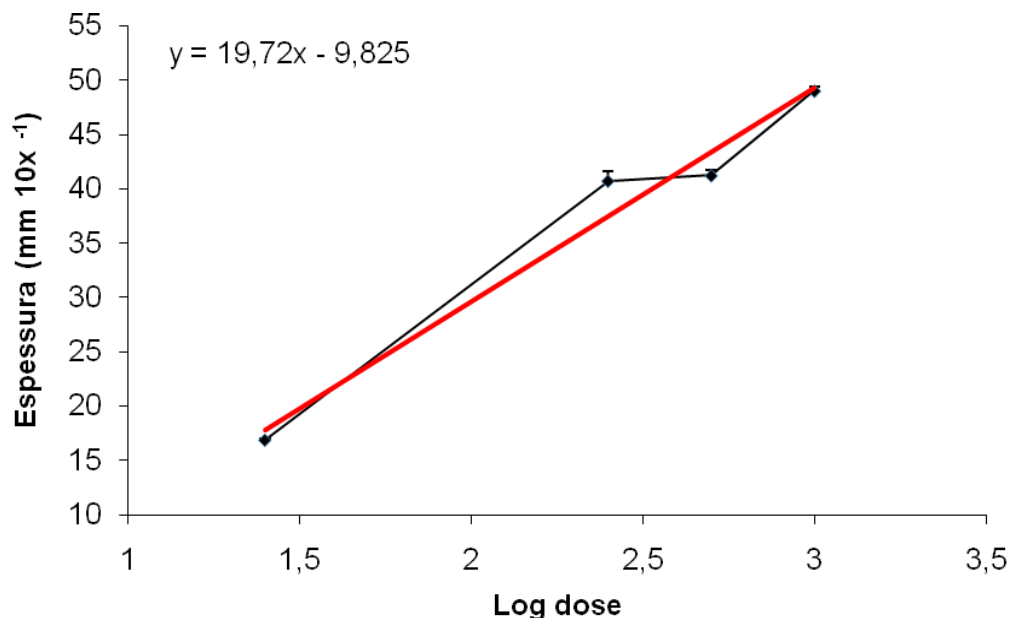


Figura 8: Curva “log dose-resposta” (edema) obtido de medidas realizadas na terceira hora após a injeção de diferentes doses de carragenina injetada na pata direita de ratos. Foram utilizadas as doses de 25, 250, 500 ou de 1000 µg de carragenina injetada

subcutaneamente na pata de ratos. O aumento da espessura (Δ) é fornecido em mm, de um total de 5 animais/ grupo. As curvas teórica (em vermelho) e experimental (em preto) foram apresentadas na figura.

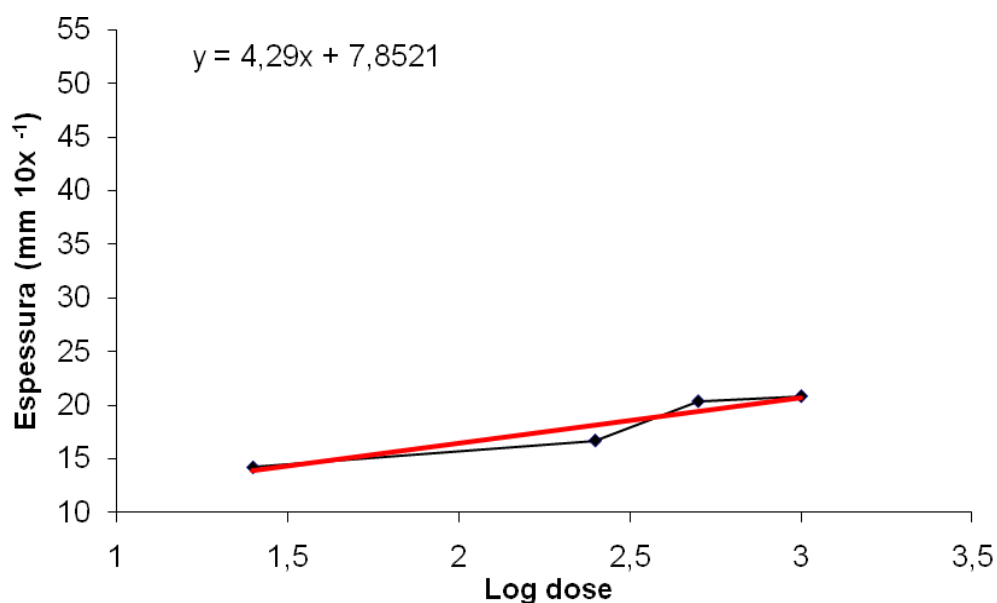


Figura 9: Curva “log dose-resposta” (edema) obtido de medidas realizadas na primeira hora após a injeção de diferentes doses de carragenina injetada na região oral direita de ratos. Foram utilizadas as doses de 25, 250, 500 ou de 1000 μg de carragenina injetada subcutaneamente na mucosa oral de ratos. O aumento da espessura (Δ) é fornecido em mm, de um total de 5 animais/ grupo. As curvas teórica (em vermelho) e experimental (em preto) foram apresentadas na figura.

5.4 Efeito edematogênico da injeção de carragenina (500 µg) administrada por via subcutânea, aplicada externamente à boca

Para se verificar em qual região a carragenina apresentaria melhor efeito edematogênico, administrou-se subcutaneamente o agente flogogênico em dois grupos distintos de animais. Um dos grupos foi injetado no tecido subcutâneo pela região interna (região mucosa oral) e o outro, pela face externa (região da epiderme estratificada). Após esse momento, foram realizadas medições nos tempos pré definidos até a sexta hora, tendo-se verificado que o aumento da espessura da boca foi ligeiramente diferente entre os dois processos, Figura 10. Entretanto, o edema derivado da injeção na região interna, após uma hora, apresentou um aumento, significativo, de 12% em sua espessura comparado com o edema derivado da região externa, indicando a escolha da administração da carragenina pela região interna.

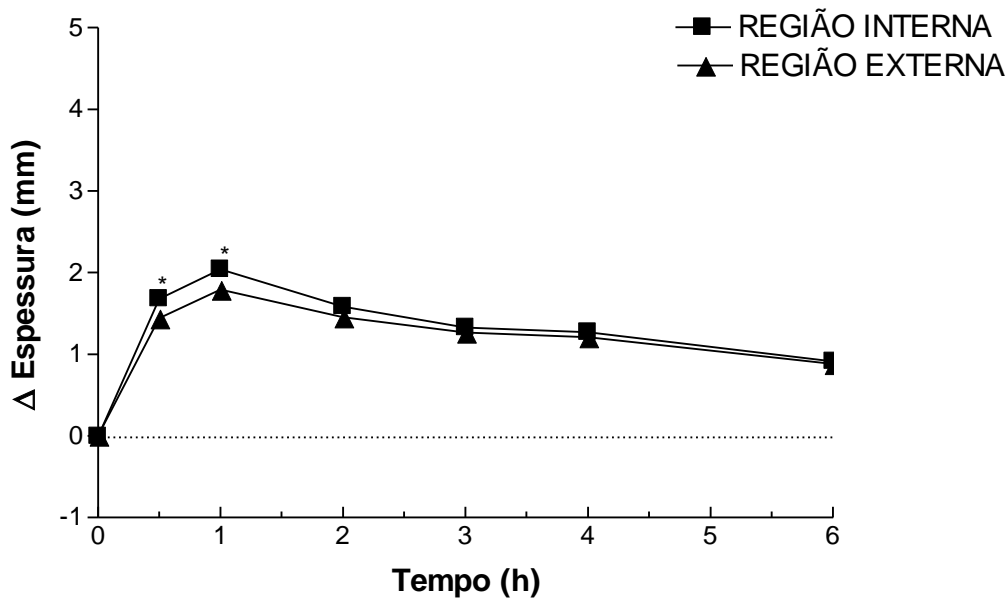


Figura 10: Edema induzido por carragenina injetada por vias distintas na região oral direita de ratos. Carragenina (CG 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{região}$) e salina fisiológica estéril (100 μl) foram injetados na região oral direita e esquerda, respectivamente. Entretanto no grupo Região Interna a administração foi na mucosa do músculo masséter da bochecha, enquanto o grupo Região Externa a administração foi pela região externa da face (músculo bucinador) formada pelo tecido epitelial estratificado. Os dados são apresentados como a média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. As variações interanimais foram estatisticamente insignificantes. $n=3-5$.

5.5 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de boca

5.5.1 Indometacina

Drogas-padrão de diferentes classes foram avaliadas no modelo de edema de boca desenvolvido. A primeira droga estudada foi um inibidor não seletivo de COX, a indometacina (2 mg/kg), que foi administrada sistemicamente, 30 minutos antes da indução do edema.

Os resultados mostraram que a indometacina reduziu em 66% o edema de boca avaliado 1 hora após a injeção de carragenina (Figura 11). Praticamente, o edema de boca foi totalmente revertido pelo tratamento prévio dos animais com indometacina, após 6 horas das injeções.

Além disso, o extravasamento do azul de Evans na mucosa oral também foi reduzido pela indometacina de forma tempo-dependente, em paralelo à redução do edema (Figuras 12 e 13). Interessante notar que, em valores absolutos, houve um maior extravasamento do corante com o aumento da inflamação induzida pela carragenina, embora a porcentagem de inibição do efeito pelo antiinflamatório-padrão (indometacina), tenha se mantido em torno de 50%.

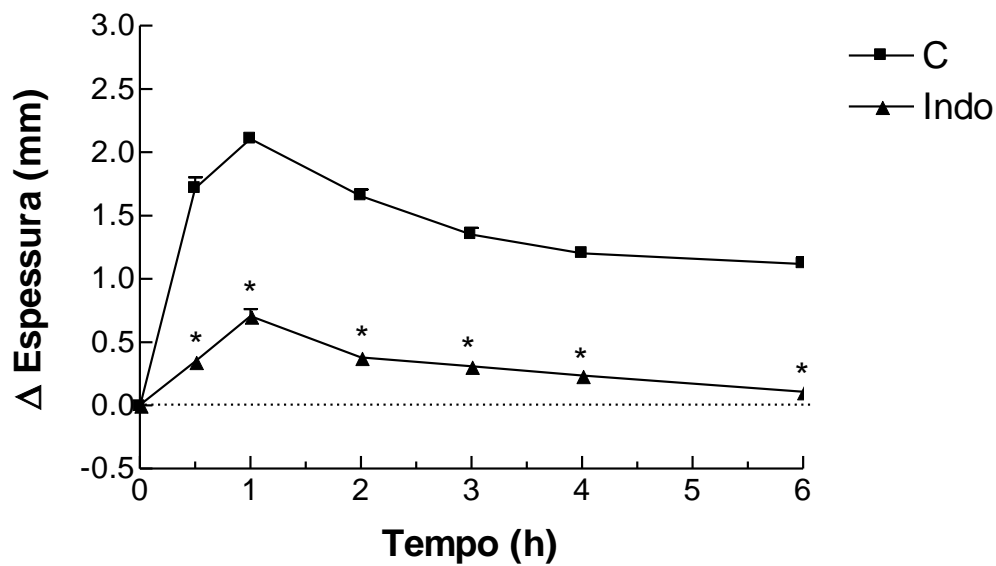


Figura 11: Efeito da indometacina sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. A indometacina (Indo 2mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam 0,1M de Tris pH 8,0 no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela indometacina na primeira hora foi de 66 % quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

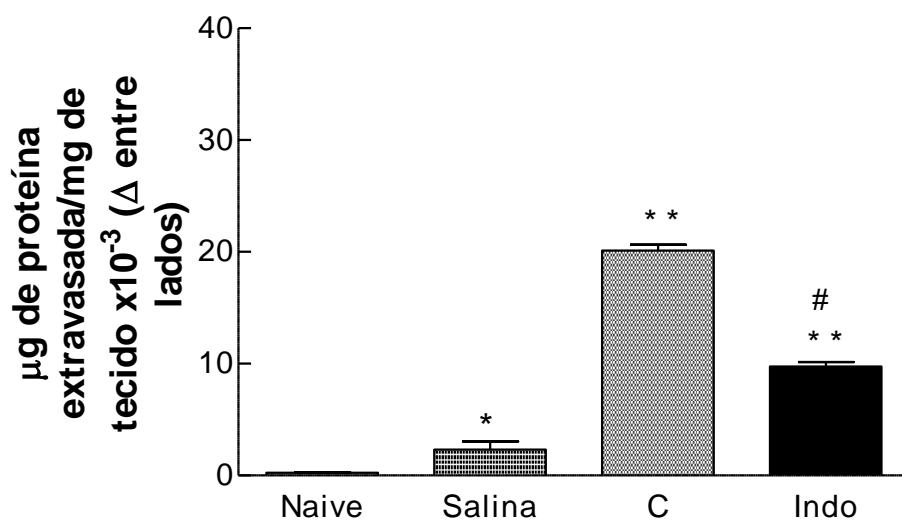


Figura 12: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

A indometacina (Indo 2mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela indometacina, quando comparada com o grupo controle, foi de 52%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

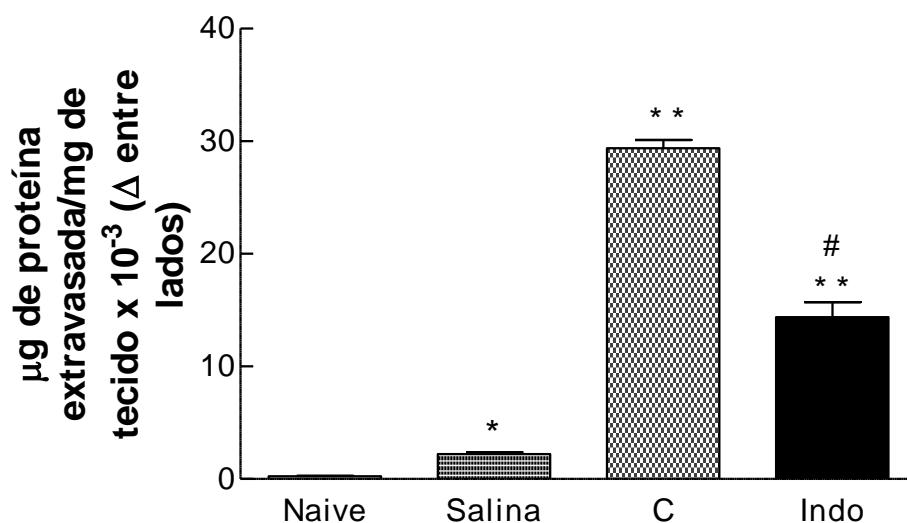


Figura 13: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A indometacina (Indo 2mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela indometacina, quando comparada com o grupo controle, foi de 51 %. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

5.5.2 Dexametasona

Semelhante ao observado com a indometacina, a dexametasona também inibiu a indução de edema pelo agente flogogênico em 68%, Figura 14, quando comparado com o resultado obtido de animais controle. Do mesmo modo, a dexametasona reduziu o extravasamento do azul de Evans intersticial em 60% nos primeiros 15 minutos e 53% após uma hora da injeção de carragenina (Figuras 15 e 16).

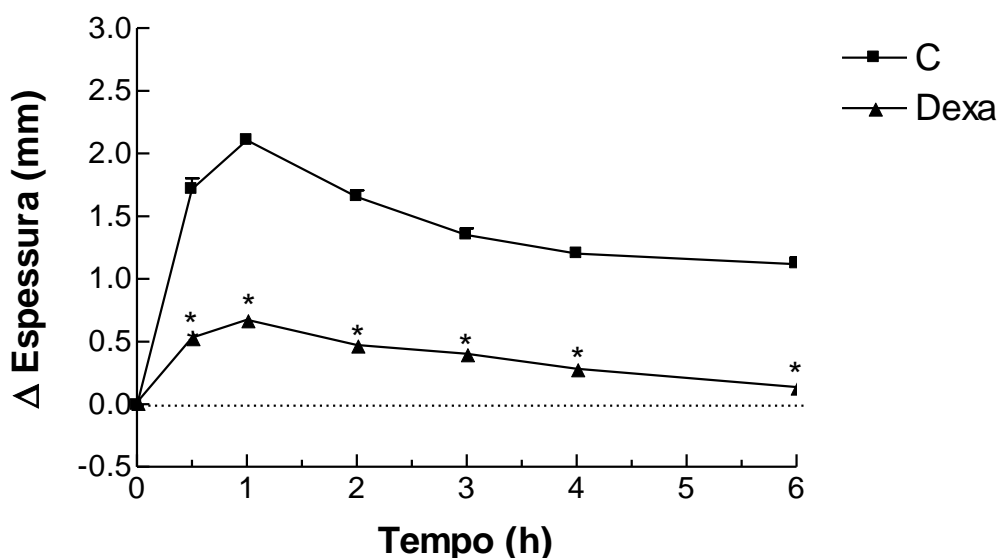


Figura 14: Efeito da dexametasona sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. A dexametasona (Dexa 1 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela dexametasona na primeira hora foi de 68 % quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média ± SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica

diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

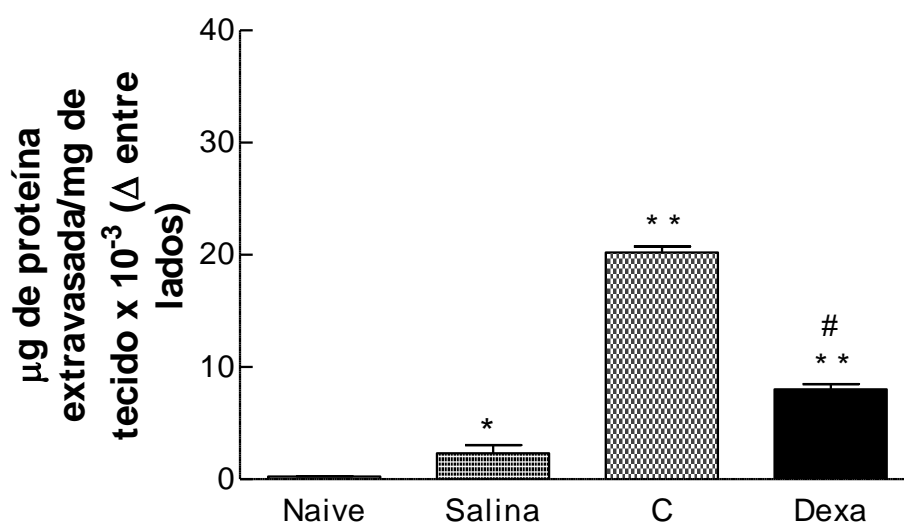


Figura 15: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

A dexametasona (Dexa 1mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela dexametasona, quando comparada com o grupo controle, foi de 60%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

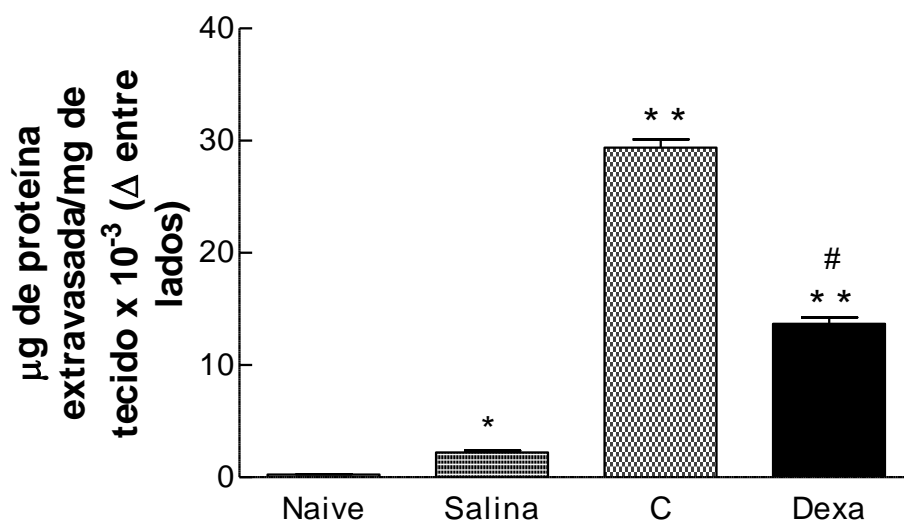


Figura 16: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A dexametasona (Dexa 1 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela dexametasona, quando comparada com o grupo controle, foi de 53%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n=5-8.

5.5.3 Celecoxibe

O celecoxibe (CX), antiinflamatório seletivo para a COX-2, foi administrado sistemicamente meia hora antes da carragenina, nas doses de 12 e 30 mg/kg. Conforme pode ser observado nas Figuras 17 e 20, o celecoxibe reduziu o edema de boca de maneira dose-dependente.

Surpreendentemente, a maior inibição do edema de boca pelo CX ocorreu 1 hora após a administração de carragenina. De maneira consistente, o celecoxibe também reduziu o extravasamento do azul de Evans de maneira dose e tempo-dependente (Figuras 18, 19, 21, e 22, respectivamente).

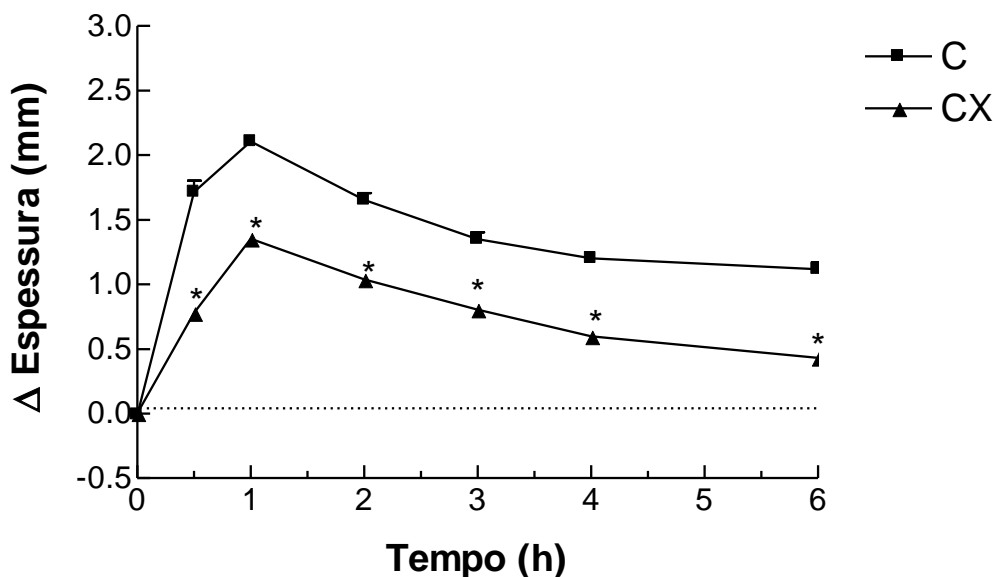


Figura 17: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C)

receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo celecoxibe na primeira hora foi de 36% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

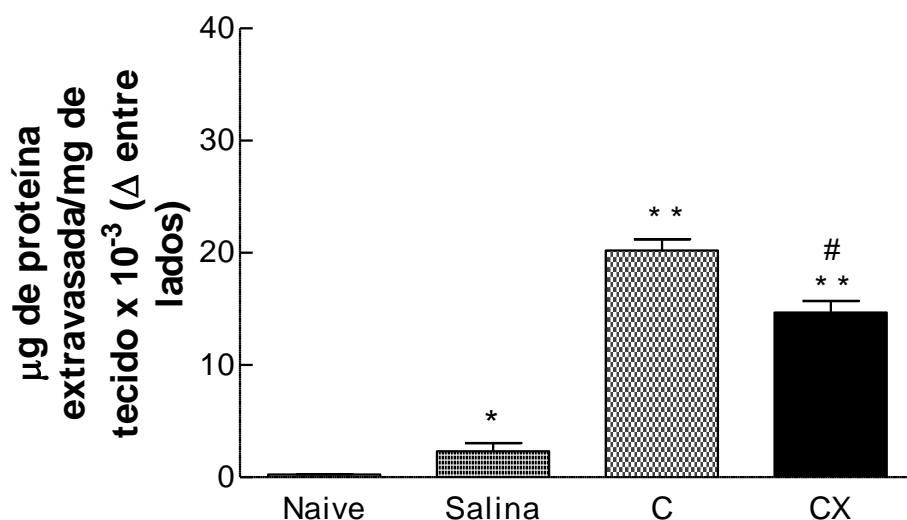


Figura 18: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela celecoxibe, quando comparada com

o grupo controle, foi de 27%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

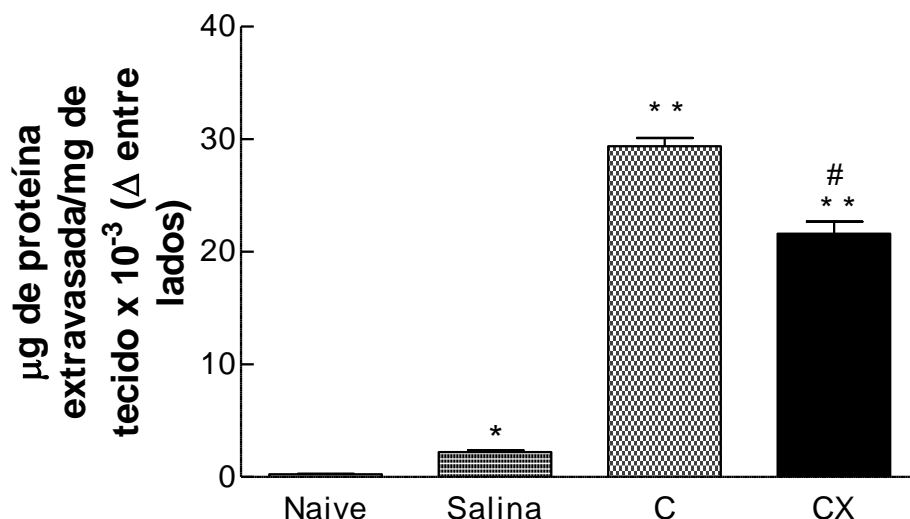


Figura 19: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 26%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

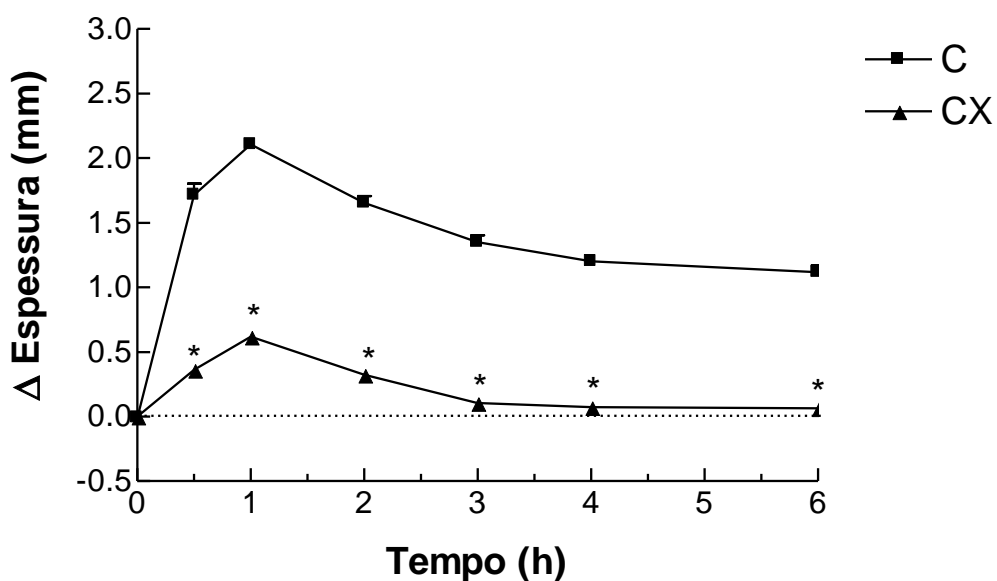


Figura 20: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo celecoxibe na primeira hora foi de 70% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

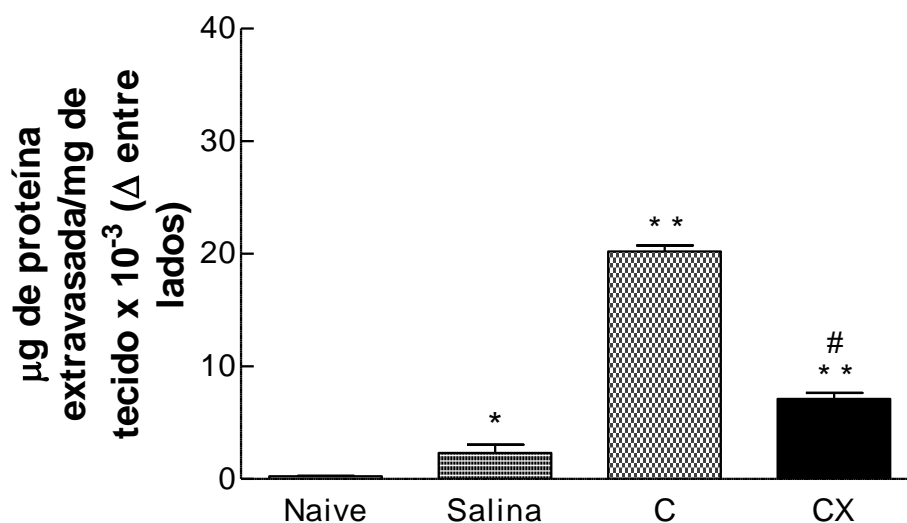


Figura 21: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 65%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

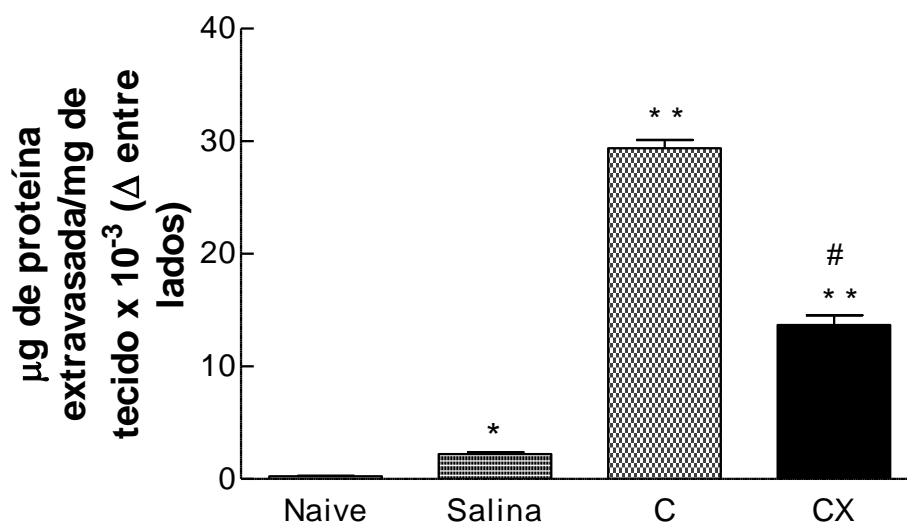


Figura 22: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. E a inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 53%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

5.5.4 Ibuprofeno

O ibuprofeno, antiinflamatório não esteróide (AINE), foi administrado 30 minutos antes da carragenina, por injeção subcutânea na dose de 20 mg/kg. Conforme pode ser observado, o antiinflamatório reduziu a ação edematogênica da carragenina em 59% na primeira hora, Figura 23. As Figuras 24 e 25 reforçam o efeito do ibuprofeno, mostrando uma redução do extravasamento de azul de Evans em 51% nos primeiros quinze minutos e na primeira hora de 52%, respectivamente.

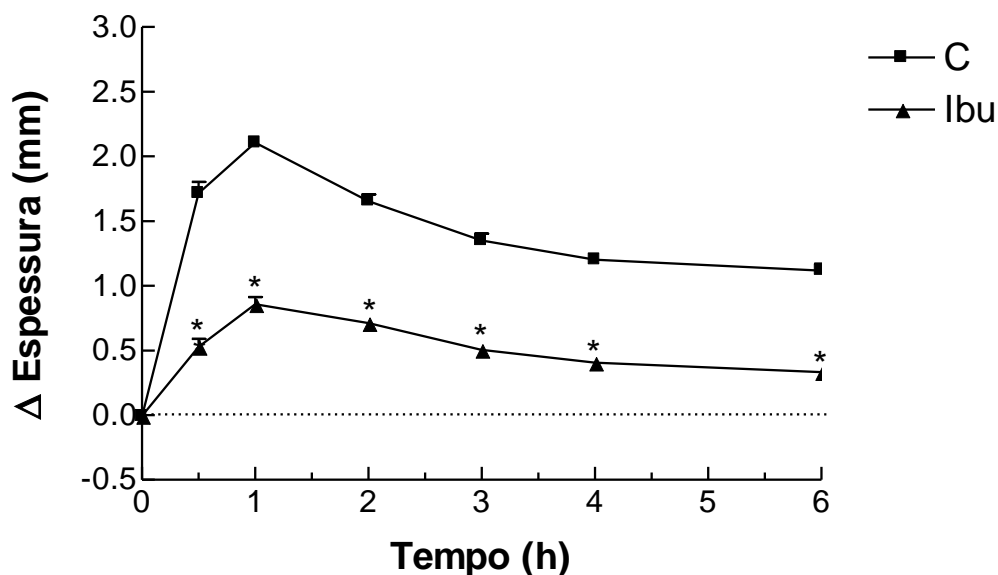


Figura 23: Efeito do ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. O ibuprofeno (Ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo ibuprofeno na primeira hora foi de 59% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média ± SEM da diferença de espessura (edema) entre a

região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

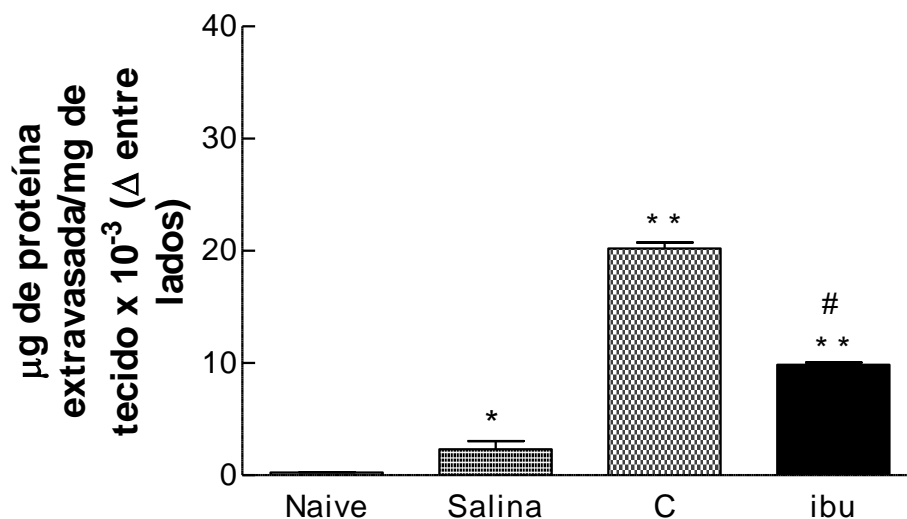


Figura 24: Efeito de ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O ibuprofeno (ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo ibuprofeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 51%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

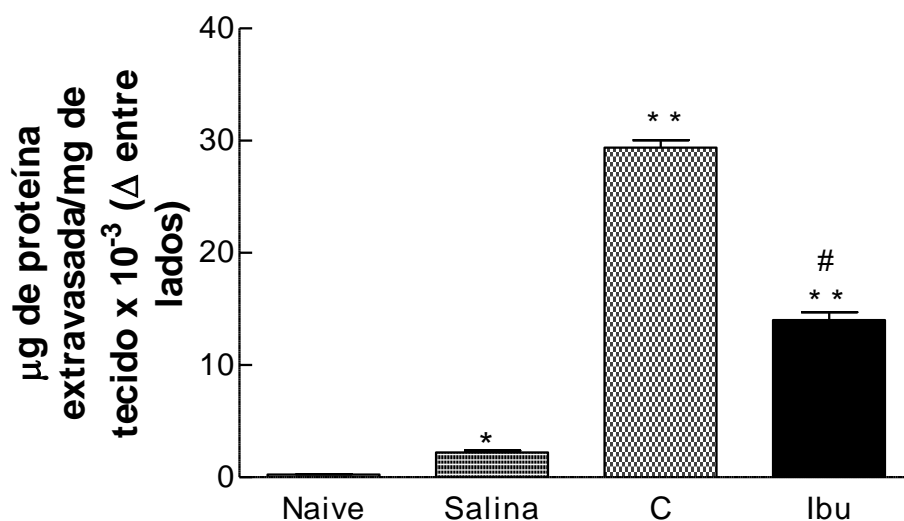


Figura 25: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O ibuprofeno (Ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo ibuprofeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 52%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.6 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre o edema de pata

5.6.1 Indometacina

Sempre quando a ação de uma droga era estudada no modelo de edema de boca, era realizado, em paralelo como controle, a análise dessa mesma droga no modelo de edema de patas traseiras em rato (padrão-ouro). Dessa forma, o antiinflamatório indometacina também foi administrado sistemicamente, na dose de 2 mg/kg, meia hora antes da agente flogogênico, carragenina, para o grupo de controle do modelo.

A ação da indometacina foi avaliada pela redução da espessura da pata em relação ao grupo que não teve a administração de antiinflamatório, grupo controle, mostrando na terceira hora após a injeção de carragenina uma inibição de 71% do edema formado (Figura 26). Outra análise também realizada para avaliar a ação do antiinflamatório foi a dosagem do azul de Evans para o espaço intersticial, que nos primeiros trinta minutos foi de 53% (Figura 27) e após três horas foi de 56% (Figura 28).

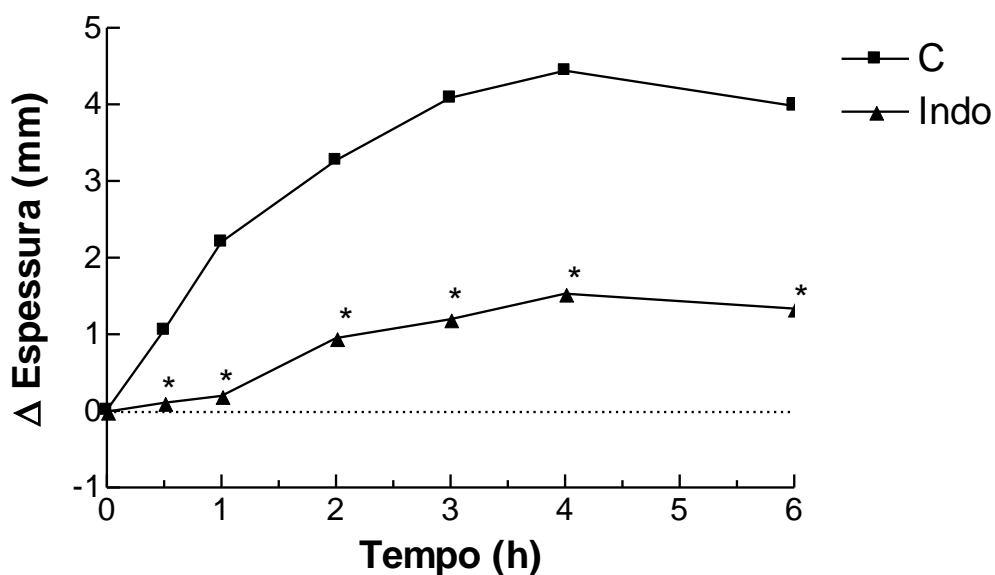


Figura 26: Efeito da indometacina sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. A indometacina (Indo 2 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam solução salina fisiológica estéril no mesmo tempo e a carragenina na zero hora. A inibição de edema pela indometacina na terceira hora foi de 71% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. n= 5-11.

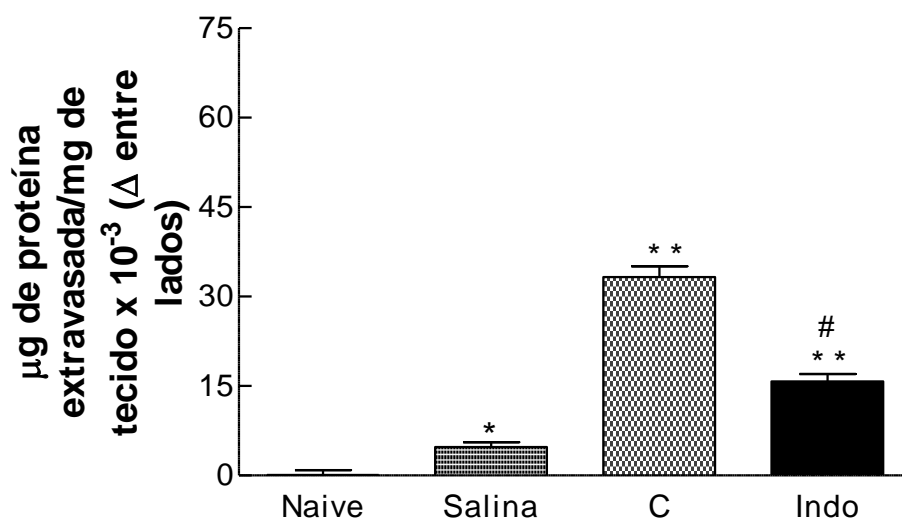


Figura 27: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A indometacina (Indo 2 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela indometacina, quando comparada com o grupo controle, foi de 53%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

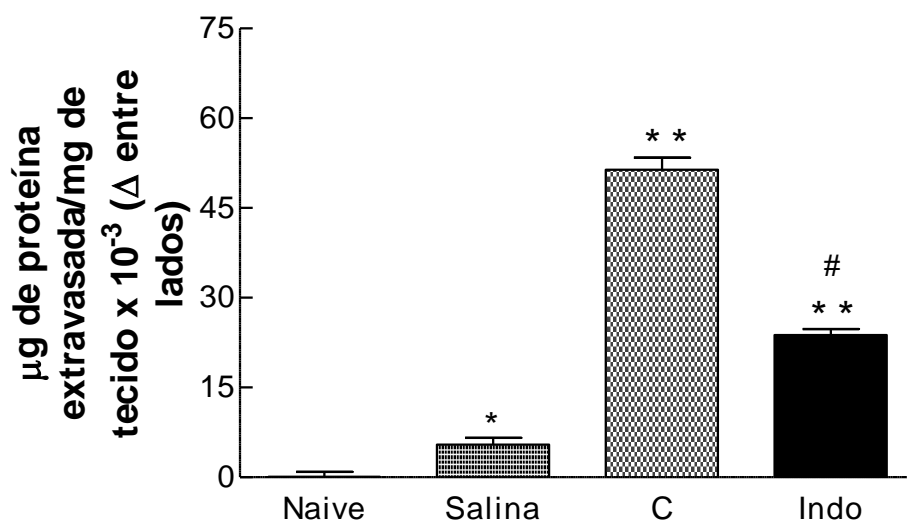


Figura 28: Efeito da indometacina sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A indometacina (Indo 2 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela indometacina, quando comparada com o grupo controle, foi de 56 %. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.6.2 Dexametasona

A dexametasona, na dose de 1 mg/kg, foi administrada sistemicamente meia hora antes da carragenina e inibiu a formação de edema quando analisada a sua espessura em 70%, na terceira hora, comparada com o grupo controle (Figura 29). Do mesmo modo, ao se estudar o extravasamento de azul de Evans a redução foi de 50 % nos primeiros trinta minutos e de 56 % após três horas (Figura 30 e 31, respectivamente).

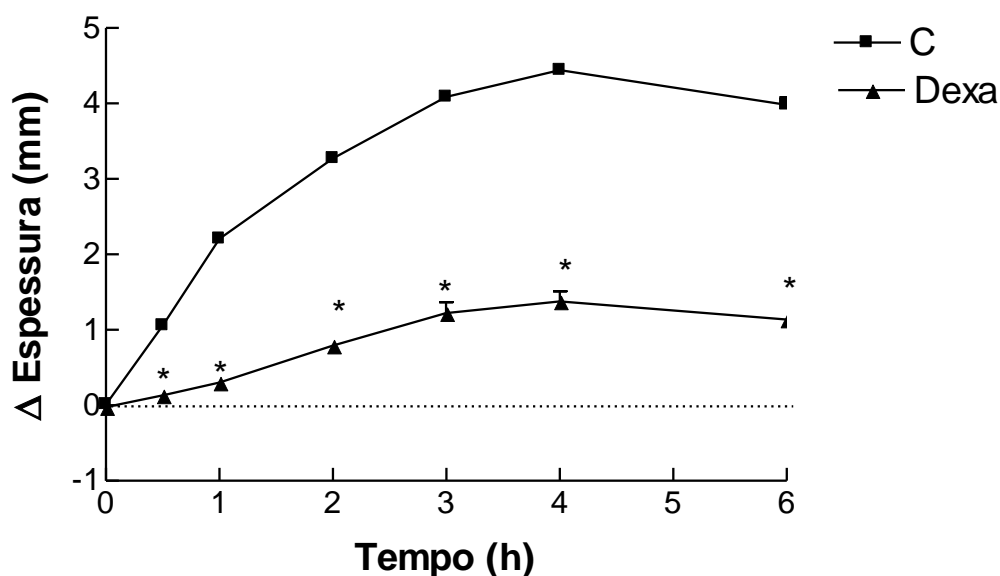


Figura 29: Efeito da dexametasona sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. A dexametasona (Dexa 1 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela dexametasona na terceira hora foi de 70% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença

estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

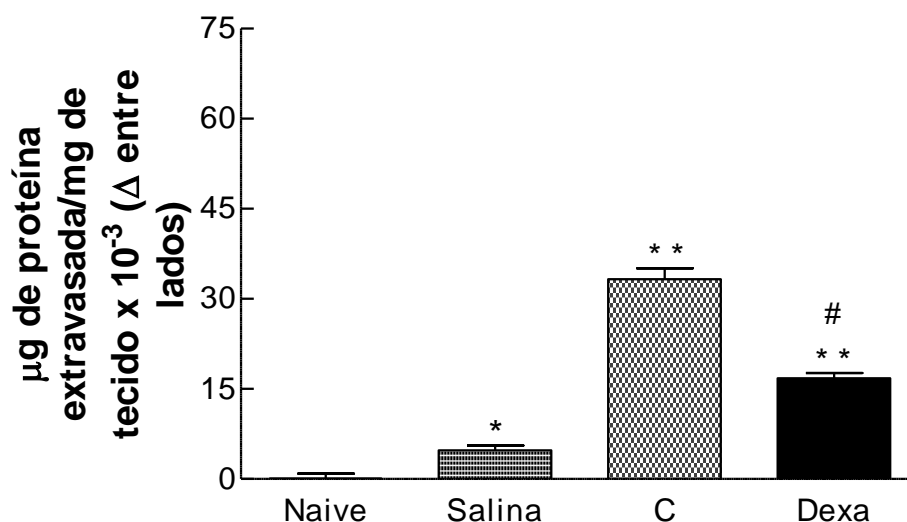


Figura 30: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A dexametasona (Dexa 1 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela dexametasona, quando comparada com o grupo controle, foi de 50%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

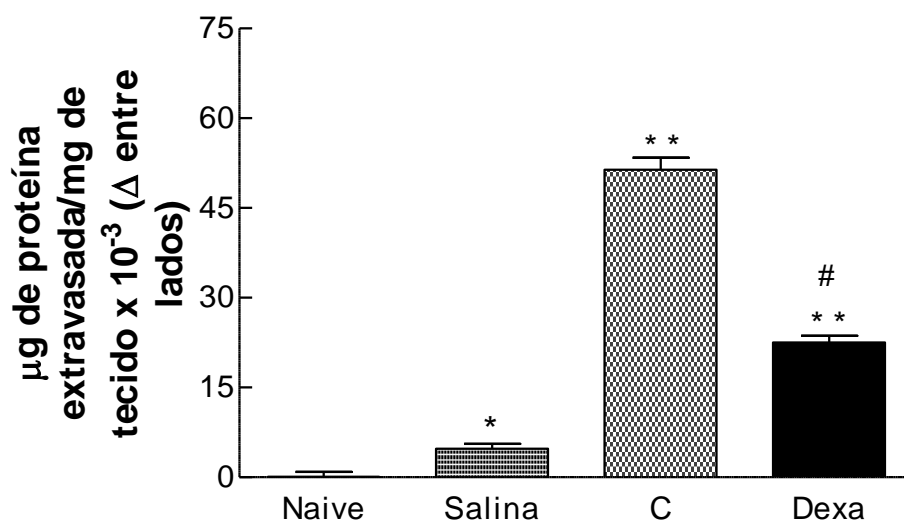


Figura 31: Efeito da dexametasona sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A dexametasona (Dexa 1 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela dexametasona, quando comparada com o grupo controle, foi de 56%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

5.6.3 Celecoxibe

O celecoxibe, administrado sistemicamente meia hora antes da carragenina, nas doses de 12 e 30 mg/kg, foram capazes de inibir a formação do edema na terceira, de maneira dose dependente, na proporção de 28% (Figura 32) e 76% (Figura 35) respectivamente.

Adicionalmente, foi realizada a análise do extravasamento do azul de Evans para celecoxibe na dosagem de 12 mg/kg e observou-se uma redução do extravasamento em 25% nos primeiros trinta minutos e de 24% após a terceira hora (Figuras 33 e 34). Já na dosagem de 30 mg/kg, a proteína extravasada foi ainda menor diminuindo nos primeiros trinta minutos 53% e após a terceira hora 59% (Figuras 35 e 36).

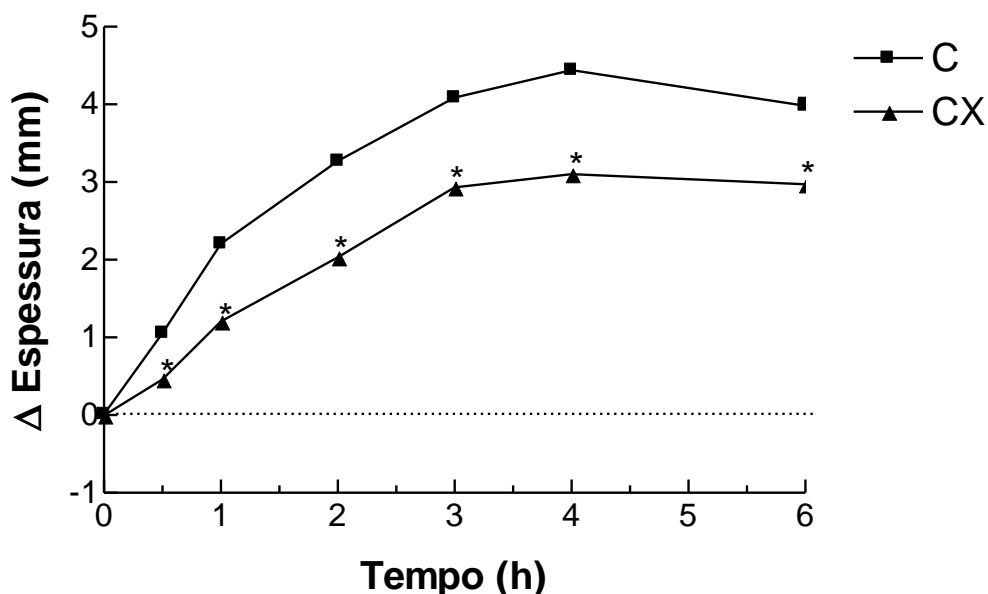


Figura 32: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora

antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo celecoxibe na terceira hora foi de 28% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

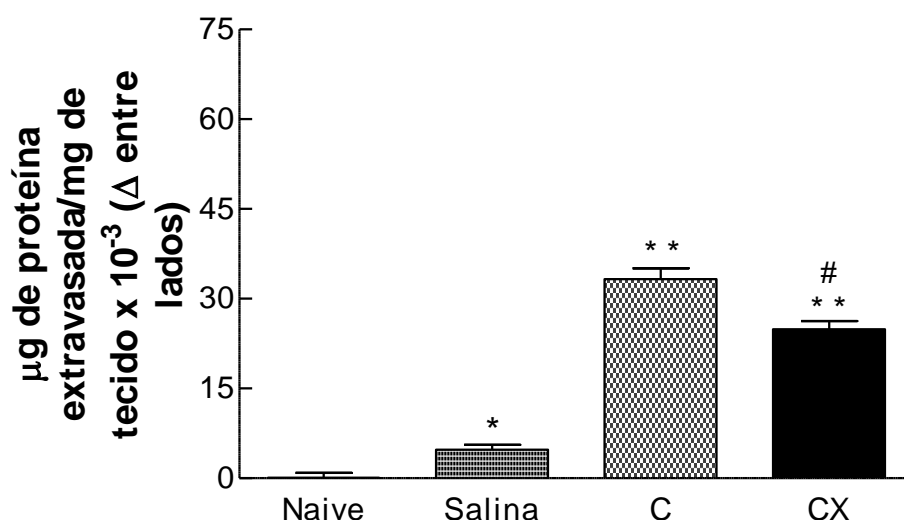


Figura 33: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda

nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 25%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

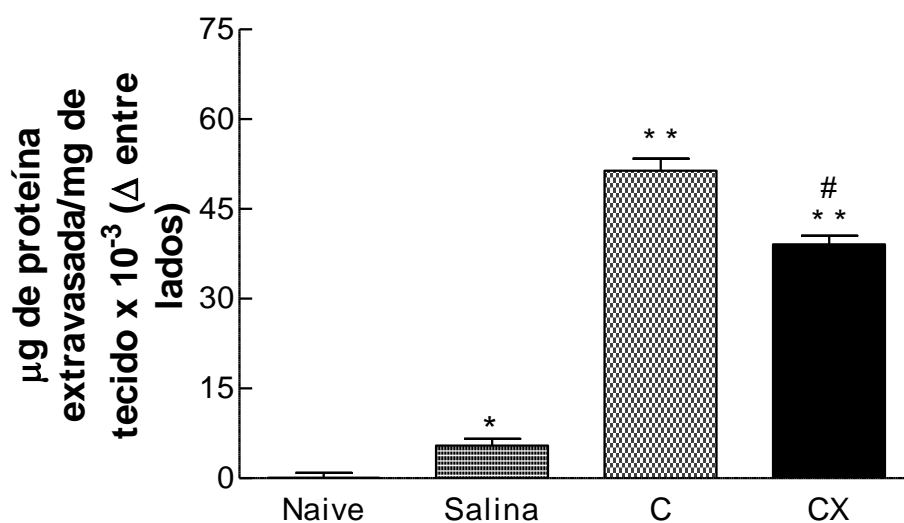


Figura 34: Efeito do celecoxibe 12 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 12 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. E a inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 24%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença

estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente.

A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

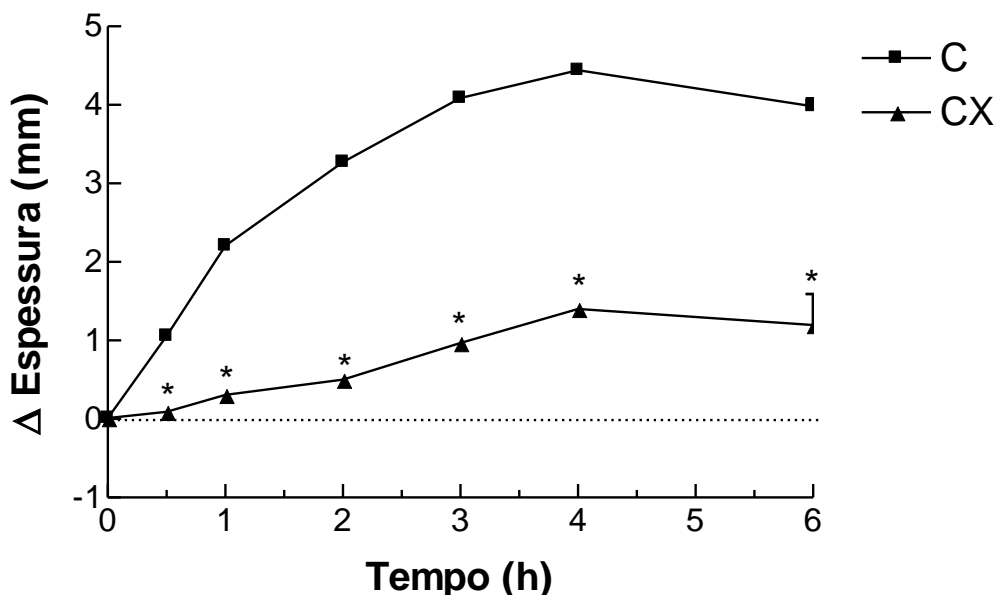


Figura 35: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam apenas salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo celecoxibe na terceira hora foi de 76% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

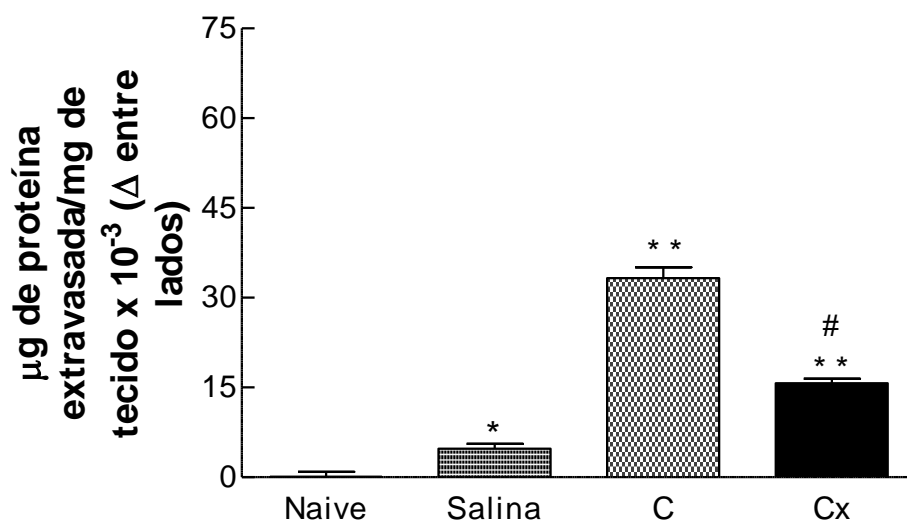


Figura 36: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 53%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

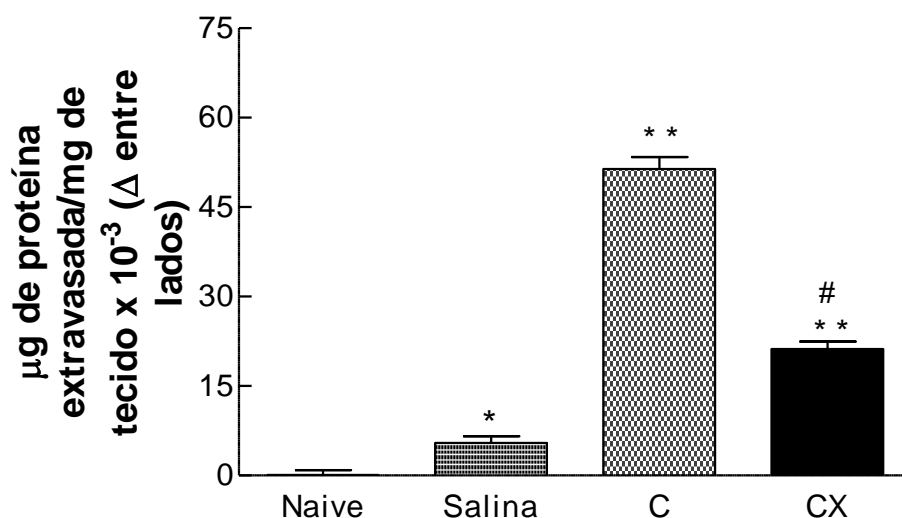


Figura 37: Efeito do celecoxibe 30 mg/kg sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O celecoxibe (CX 30 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo celecoxibe, quando comparada com o grupo controle, foi de 59 %. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.6.4 Ibuprofeno

No gráfico 33 é possível observar que o antiinflamatório ibuprofeno, na dose de 20 mg/kg, foi capaz de conter a ação edematogênica do agente flogogênico carragenina, em 46% na terceira hora (Figura 38) . Essa inibição do edema pelo ibuprofeno foi estudada também pelo extravasamento de azul de Evans que após trinta minutos da indução de edema havia reduzido 47 % e após a terceira hora 51%, resultados esses obtidos quando comparados com o grupo controle e estão apresentados nas Figuras 39 e 40.

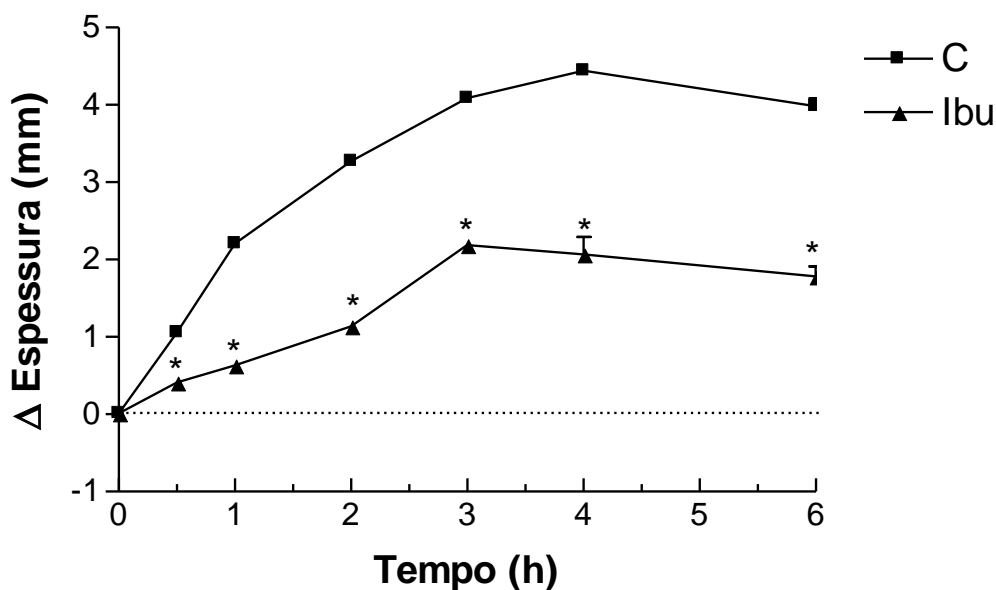


Figura 38: Efeito do ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. O ibuprofeno (Ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo ibuprofeno na terceira hora foi de 46% quando comparada com o grupo controle. Os dados

são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

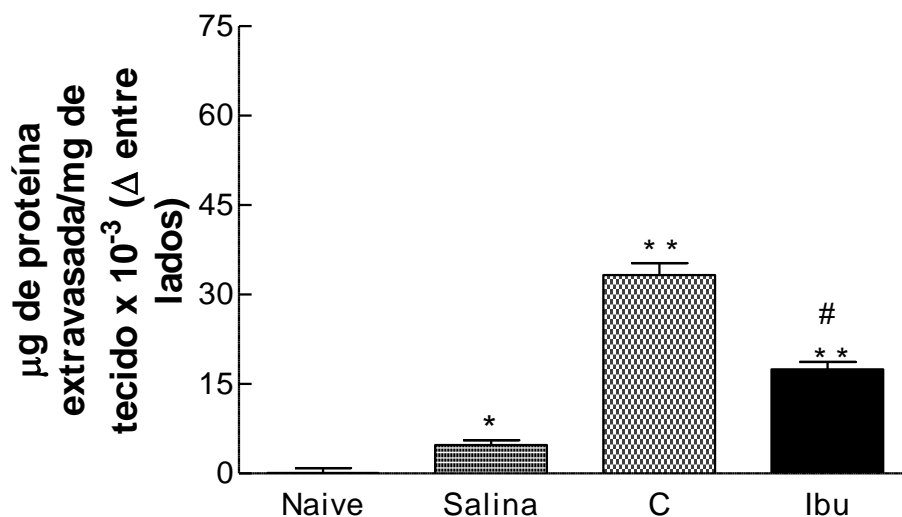


Figura 39: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O ibuprofeno (Ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo ibuprofeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 47%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: Naive, Salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

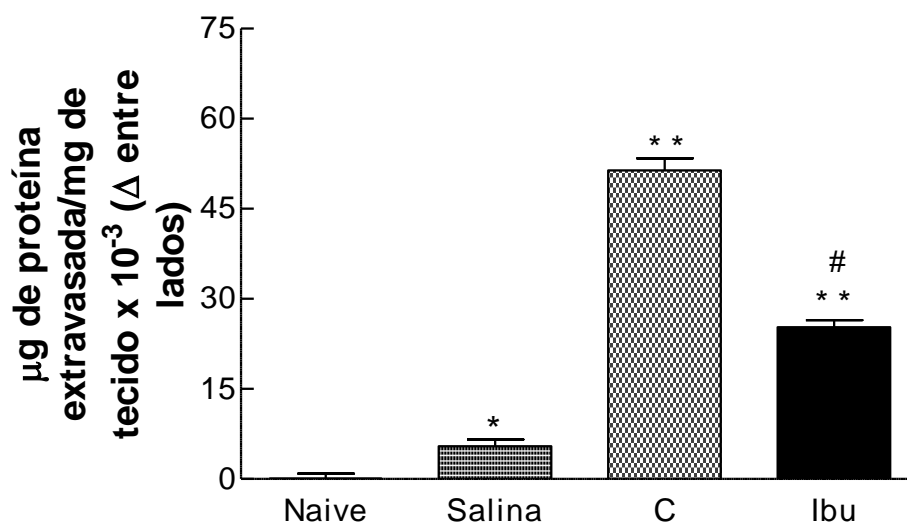


Figura 40: Efeito do ibuprofeno sobre o extravasamento de Azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O ibuprofeno (Ibu 20 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo ibuprofeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 51%. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,05). Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni n= 5-8.

5.7 Efeito de drogas antagonistas sobre o edema de boca

5.7.1 Maleato de pirilamina

Para identificar os agentes na inflamação gerada pela carragenina, foi administrado nos animais antagonistas dos mediadores inflamatórios possivelmente atuantes na fase inicial da inflamação gerada pela carragenina.

Dessa forma, foi administrado via sistêmica 30 minutos antes da indução de edema pelo agente flogogênico, carragenina, um antagonista dos receptores H₁ de histamina, a pirilamina na dosagem de 10mg/kg.

Os resultados mostraram que a pirilamina reduziu, significativamente, em 70% o edema na boca avaliado na primeira hora após a injeção de carragenina (Figura 41). O que foi confirmado ao se avaliar o extravasamento de azul de Evans que se reduziu em 79% nos primeiros quinze minutos e após a primeira hora 39% quando comparados com o grupo controle. Os resultados se encontram apresentados nas Figuras 42 e 43.

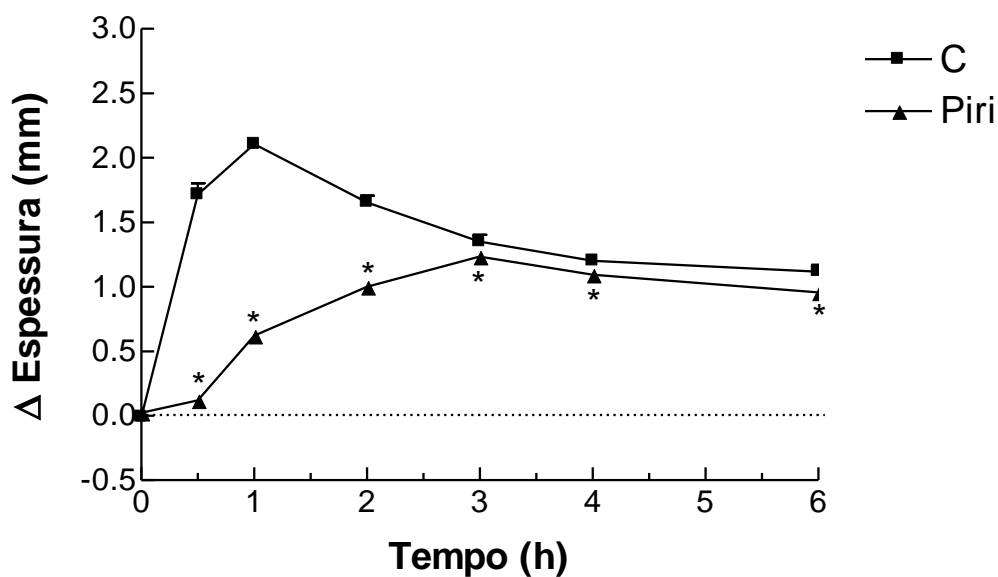


Figura 41: Efeito da pirilamina sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. A pirilamina (Piri 10mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela indometacina primeira hora foi de 70% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

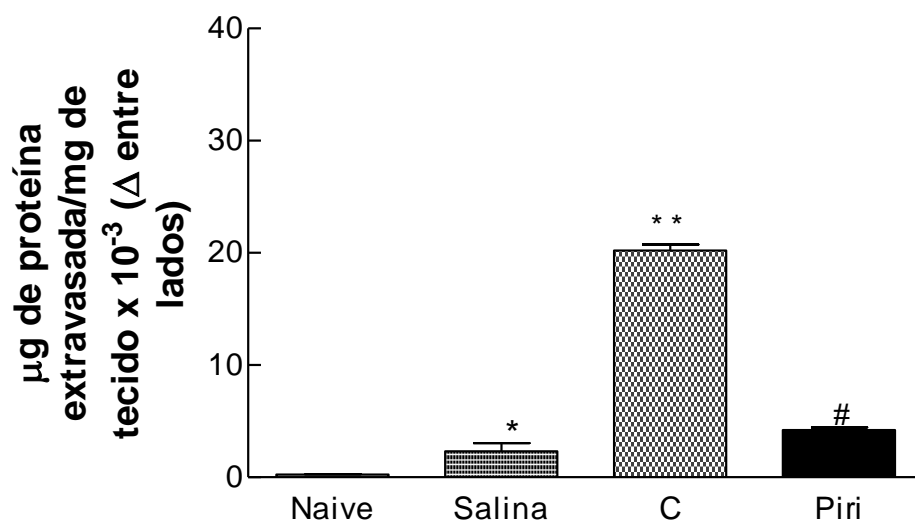


Figura 42: Efeito da pirilamina sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A pirilamina (Piri 10mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela pirilamina, quando comparada com o grupo controle, foi de 79%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

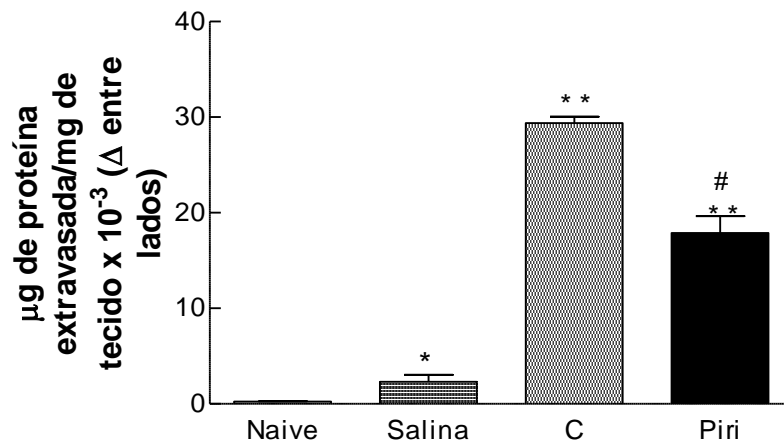


Figura 43: Efeito da pirilamina sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A pirilamina (Piri 10mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela pirilamina, quando comparada com o grupo controle, foi de 39%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.7.2 Maleato de pizotifeno

O pizotifeno ou maleato de pizotifeno, um antagonista da serotonina e inibidor dos receptores H_1 da histamina, foi administrado sistemicamente na dosagem de 2 mg/kg trinta minutos antes da indução de edema pela carragenina.

E semelhante ao observado com a pirlamina, o pizotifeno também inibiu significativamente o edema induzido em 72% na primeira hora, Figura 44, quando comparado com o resultado dos animais controle. Do mesmo modo o extravasamento do azul de Evans foi de 77% nos primeiros quinze minutos e de 36% após uma hora da injeção de carragenina, Figuras 45 e 46 respectivamente.

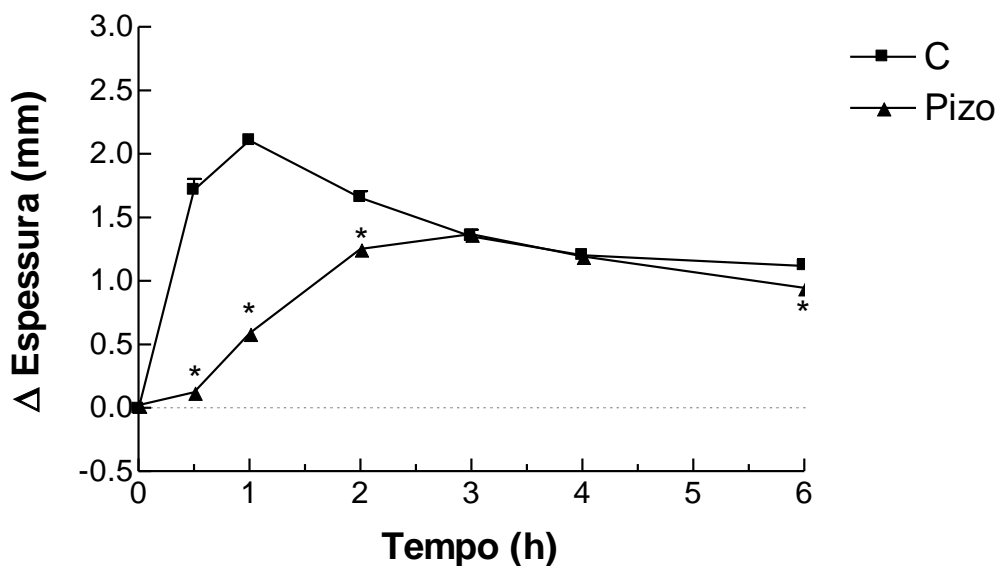


Figura 44: Efeito do pizotifeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina

fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pelo pizotifeno na primeira hora foi de 72% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

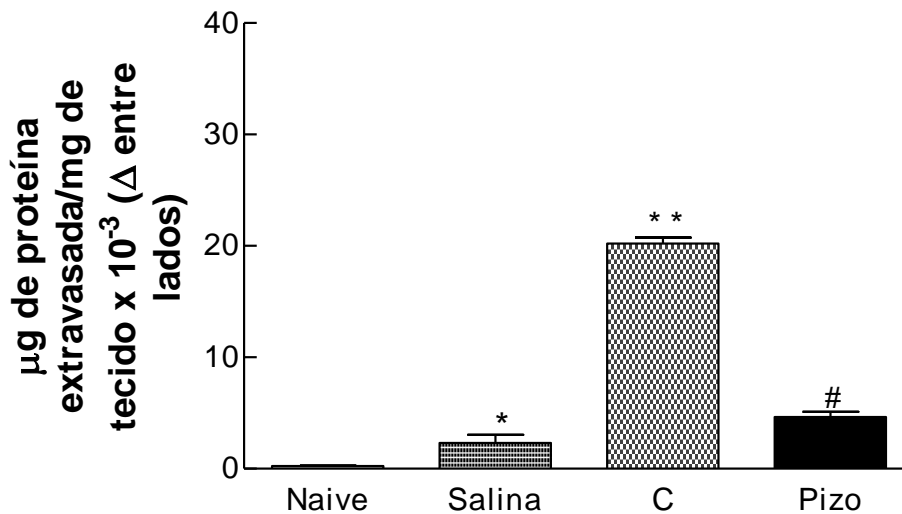


Figura 45: Efeito do pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo pizotifeno, quando

comparada com o grupo controle, foi de 77%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

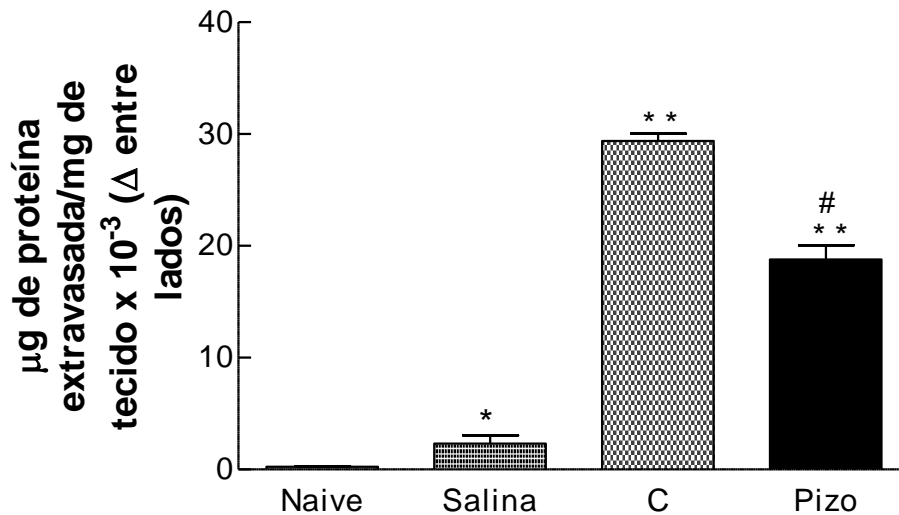


Figura 46: Efeito do pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo pizotifeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 36%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni $n = 5-8$.

5.8 Efeito de drogas antagonistas sobre o edema de pata

5.8.1 Maleato de pirilamina

A avaliação da ação dos antagonistas também foi realizada no modelo de edema de patas traseiras, servindo como controle dos experimentos no modelo de edema da boca. Dessa forma, o maleato de pirilamina como no modelo de edema de boca foi administrado trinta minutos antes da carragenina. E a ação inibitória do antagonista foi avaliada na terceira hora, momento em que há o efeito máximo da carragenina, apresentando uma inibição significativa de 6% em relação ao grupo controle, Figura 47.

Da mesma forma, foi avaliado o extravasamento de azul de Evans, que apresentou nos primeiros trinta minutos uma redução de 73% momento que há ação principalmente de serotonina e histamina e após a terceira hora a redução era de apenas 18% quando há ação predominantemente dos derivados do ácido araquidônico (Figuras 48 e 49 respectivamente).

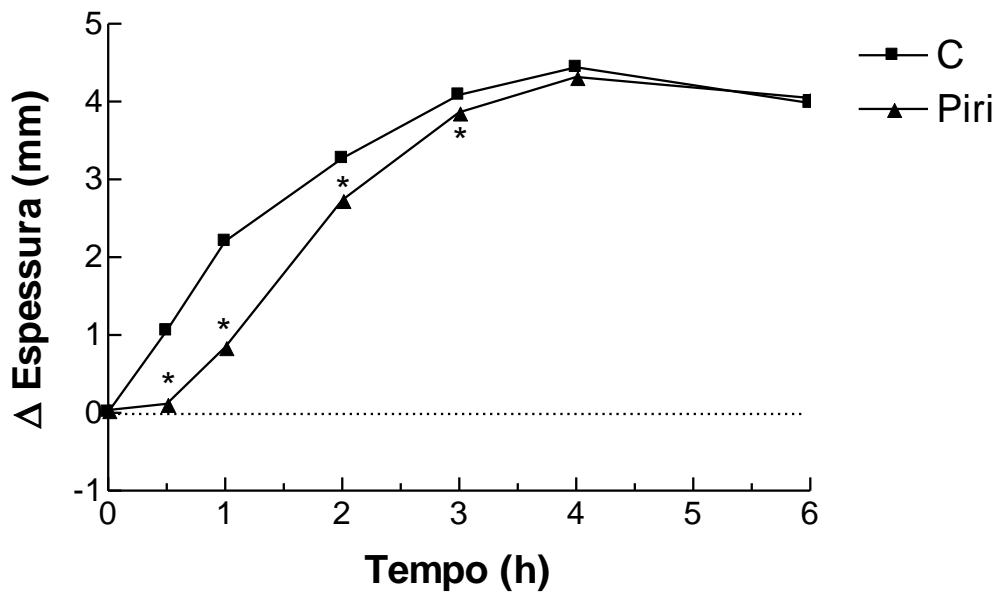


Figura 47: Efeito da pirilamina sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. A pirilamina (Piri 10 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam solução salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela indometacina na terceira hora foi de 6 % quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. n= 5-11.

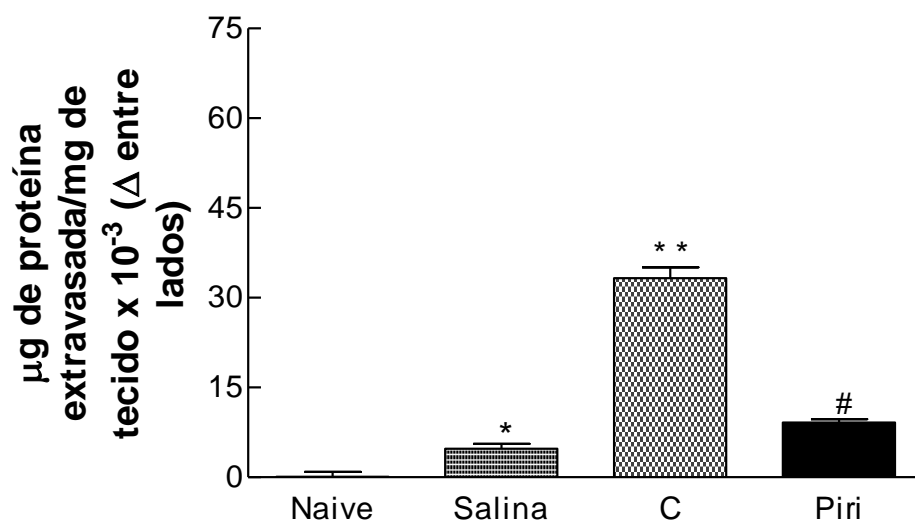


Figura 48: Efeito da pirilamina sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A pirilamina (Piri 10 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela pirilamina, quando comparada com o grupo controle, foi de 73%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

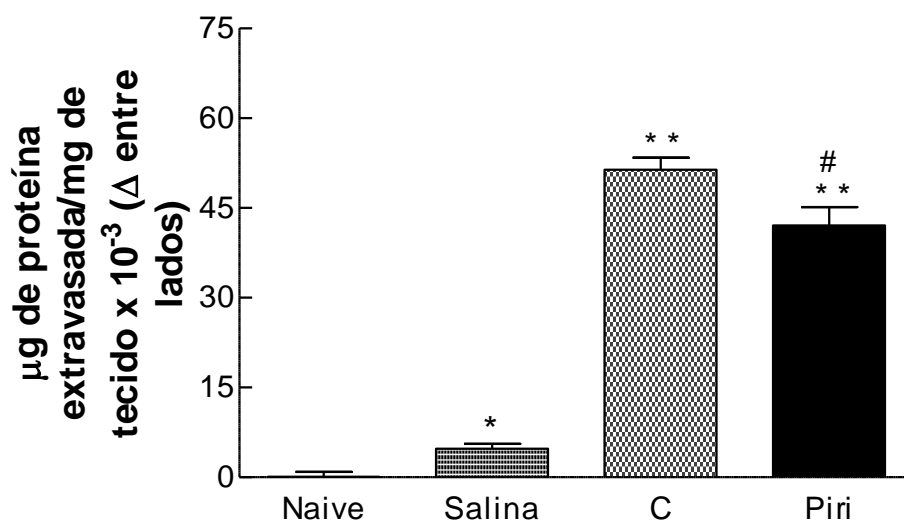


Figura 49: Efeito da pirilamina sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A pirilamina (Piri 10 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela pirilamina, quando comparada com o grupo controle, foi de 18%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.8.2 Maleato de pizotifeno

Da mesma forma, o pizotifeno foi administrado sistemicamente trinta minutos antes do agente flogogênico e teve sua ação avaliada na terceira hora mostrando uma significativa inibição do edema de 13%, resultado esse indicado na Figura 50.

Em seguida, foi estudada a ação do pizotifeno no extravasamento plasmático através do corante azul de Evans. O pizotifeno, quando comparado com o grupo controle, reduziu o extravasamento de azul de Evans nos primeiros trinta minutos em 74% enquanto na terceira hora a redução foi de apenas 22% (Figuras 51 e 52, respectivamente).

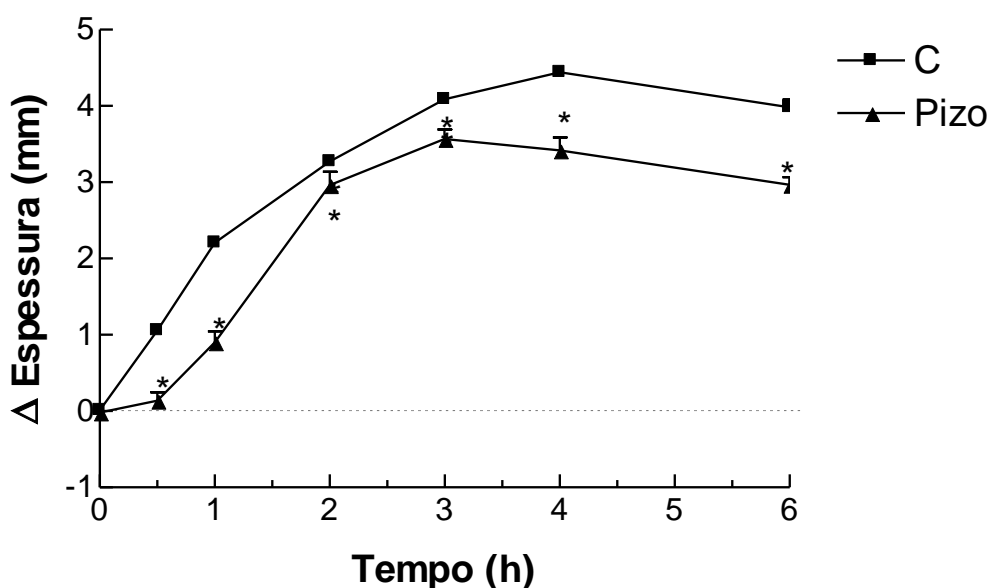


Figura 50: Efeito da pizotifeno sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam solução salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela pizotifeno na terceira hora foi de 13% quando comparada com o grupo controle. Os

dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

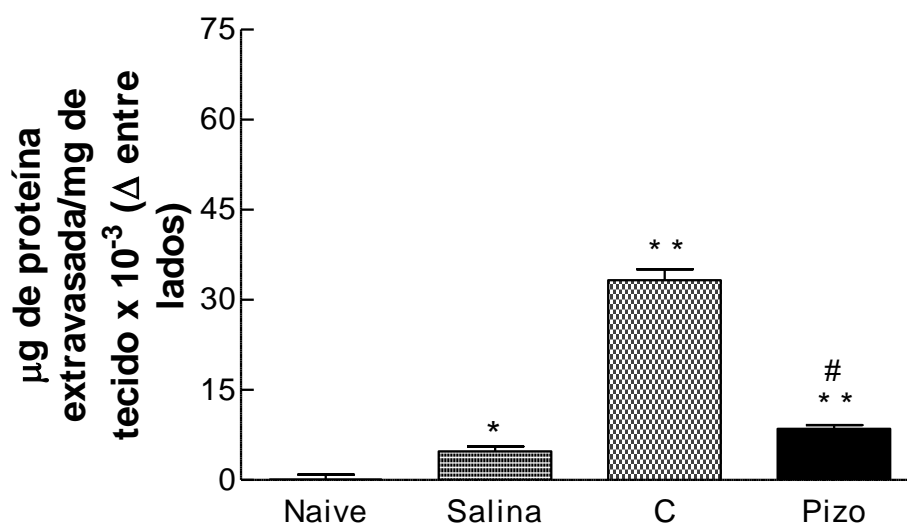


Figura 51: Efeito da pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo pizotifeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 74%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística

($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

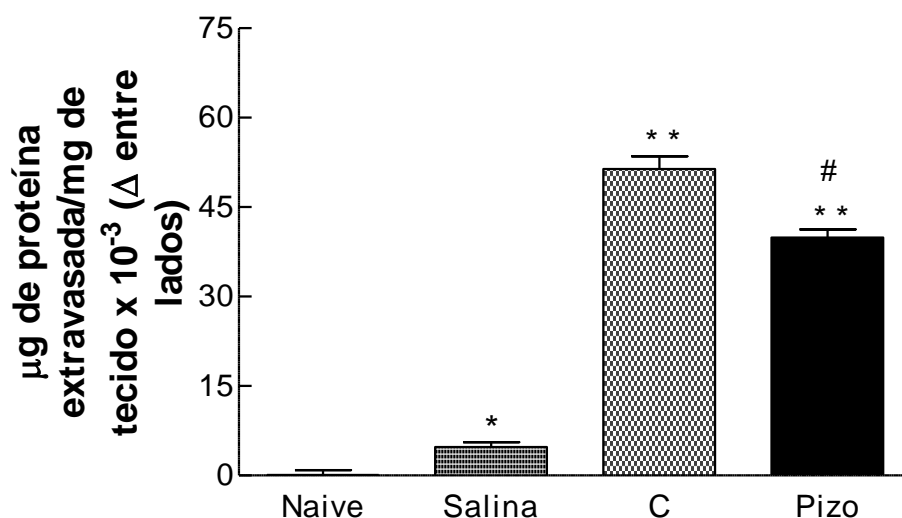


Figura 52: Efeito da pizotifeno sobre o extravasamento de azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. O pizotifeno (Pizo 2 mg/kg) foi injetado subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100 $\mu\text{l}/\text{animal}$) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média \pm SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pelo pizotifeno, quando comparada com o grupo controle, foi de 22%. Os símbolos *, ** e # indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo para os grupos: naive, salina e C, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

5.9 Utilização do modelo de boca para estudo de novos medicamentos antiinflamatórios

5.9.1 Substância F

A substância F, um novo composto sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa, teve seus efeitos avaliados tanto no novo modelo de edema de boca quanto no modelo de edema de patas traseiras. Para isso, a nova droga, na dose de 12 mg/kg, foi administrada via subcutânea trinta minutos antes da carragenina. E sua ação foi avaliada tanto por medidas de espessura quanto pelo extravasamento de Azul de Evans para o espaço intersticial da boca de ratos.

Como realizado anteriormente, o estudo da ação da nova droga foi realizada no momento em que a carragenina tinha seu efeito máximo. Dessa forma a avaliação na região oral ocorreu na primeira hora quando teve uma inibição não significativa de 9% e na pata na terceira hora e quarta hora tendo uma inibição significativa de 7% (Figuras 53 e 56, respectivamente)

Em seguida, ao se avaliar a ação da substância F no extravasamento de Azul de Evans, observou-se que o material extravasado no novo modelo de edema de boca nos primeiros quinze minutos foi de 15% (Figura 54) e após a primeira hora 10% (Figura 55), enquanto no modelo de patas traseiras foi de 4% (Figura 57) nos primeiros trinta minutos e após a terceira hora de 6% (Figura 58), sendo todos não significativos em relação ao grupo controle (carragenina).

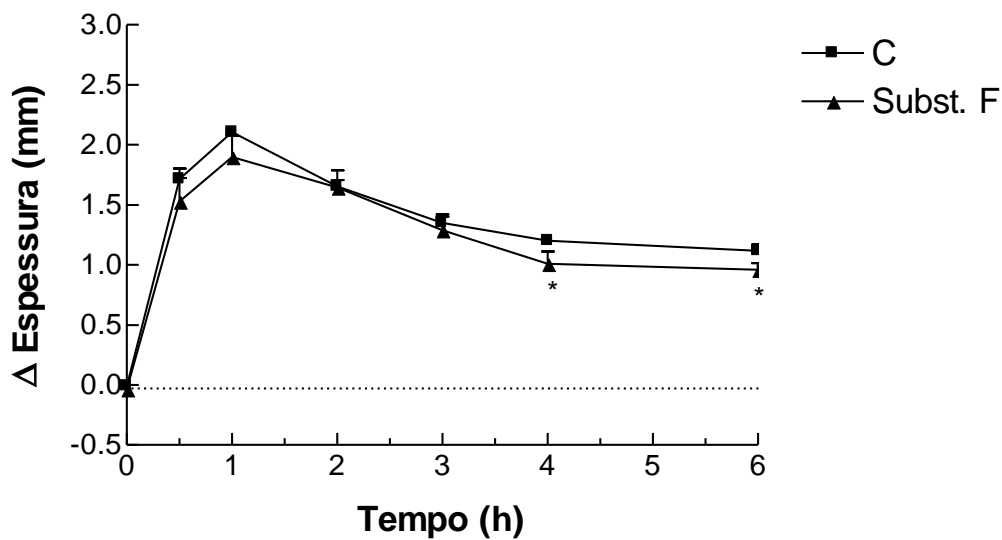


Figura 53: Efeito da substância F sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μ g/100 μ l/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela substância F na primeira hora foi de 9% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

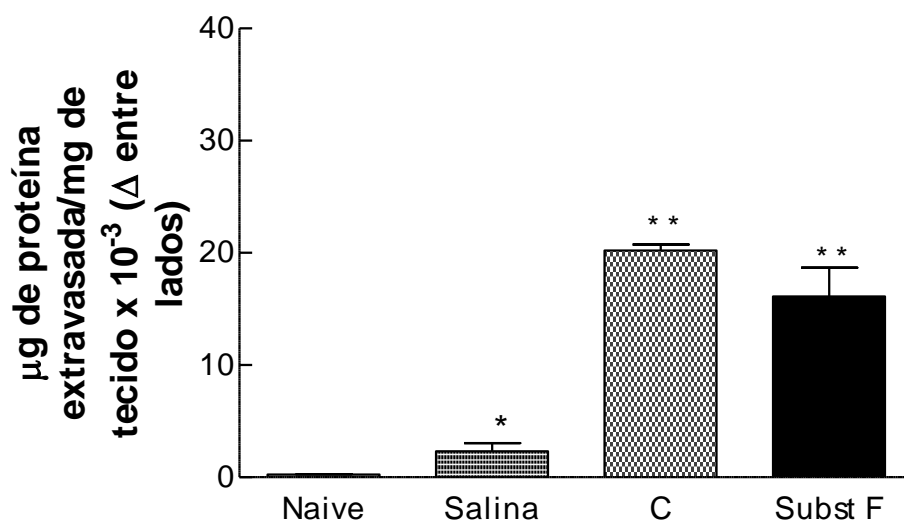


Figura 54: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos.

A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela substância F, quando comparada com o grupo controle, foi de 15%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

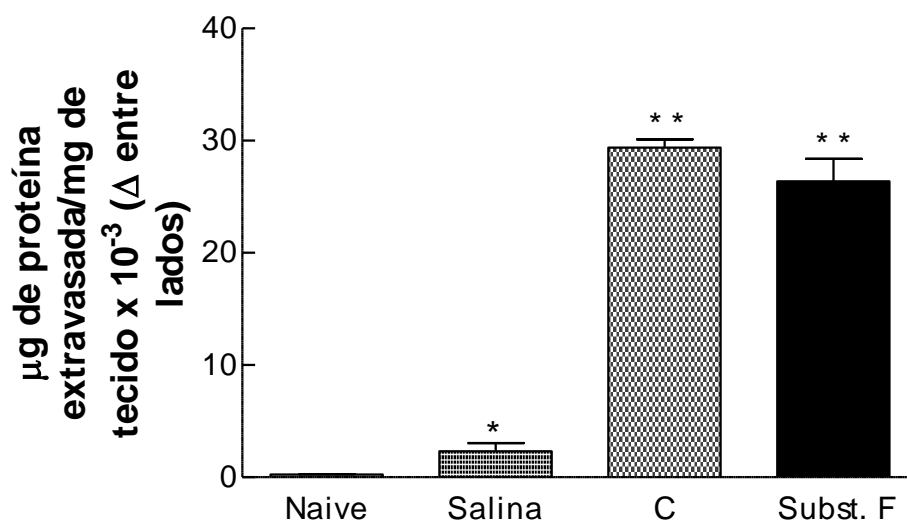


Figura 55: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 µg/100µl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela substância F, quando comparada com o grupo controle, foi de 10%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

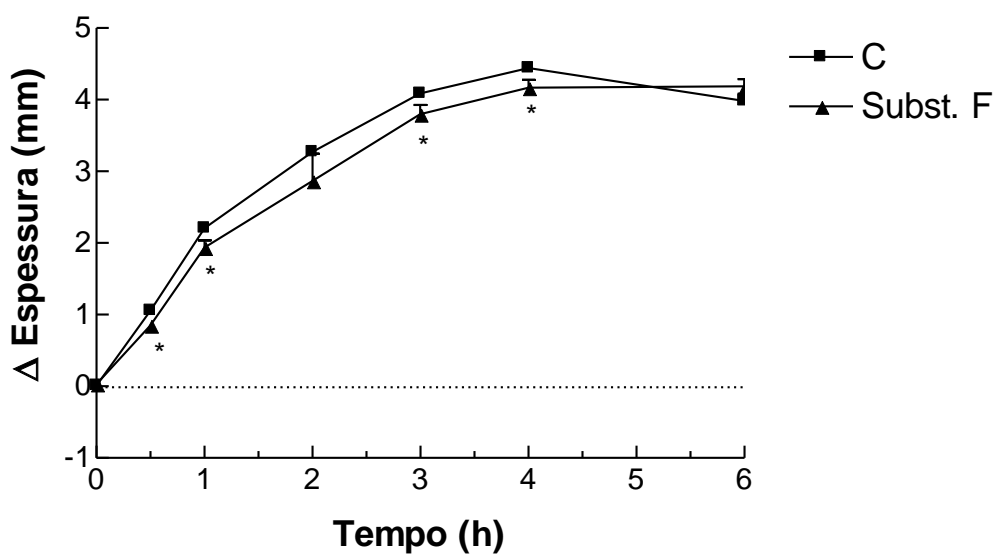


Figura 56: Efeito da substância F sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela substância F na terceira hora foi de 7% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm SEM da diferença de espessura (edema) entre a pata direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

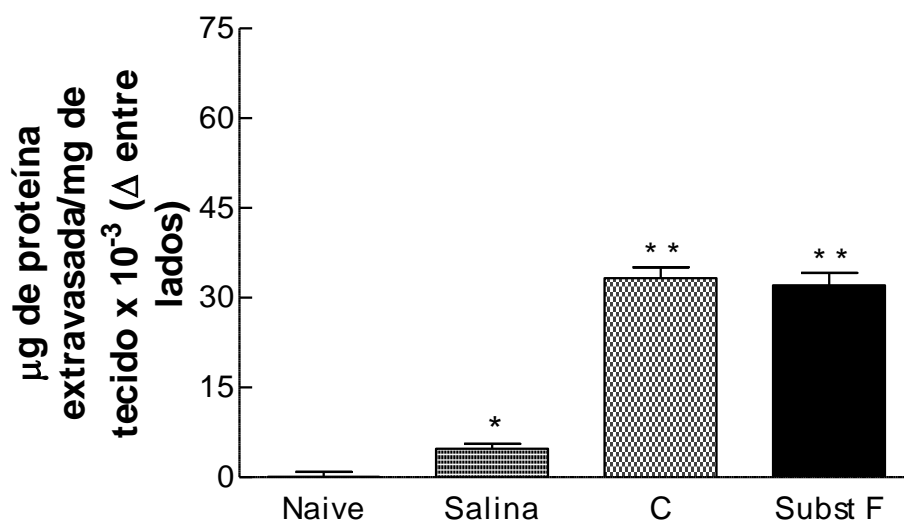


Figura 57: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela substância F, quando comparada com o grupo controle, foi de 4%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

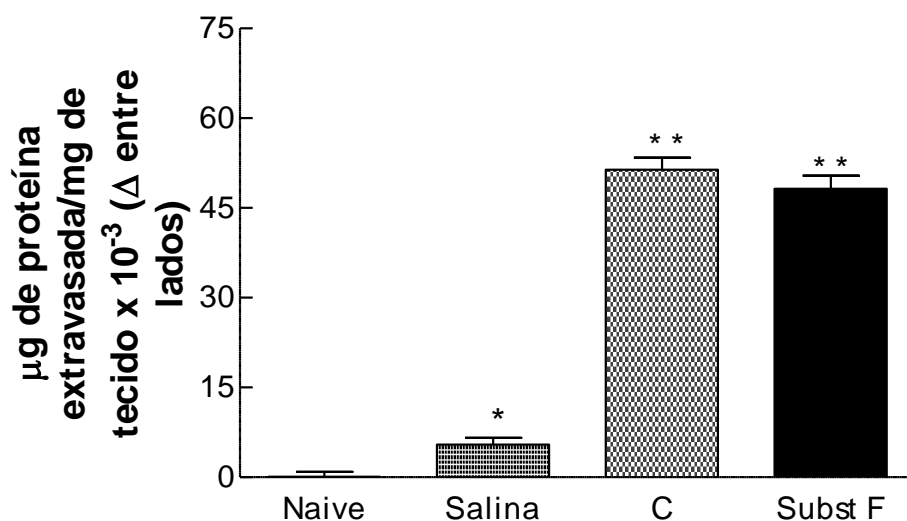


Figura 58: Efeito da substância F sobre o extravasamento de Azul de Evans 2,5% na terceira hora após a indução de edema com carragenina na pata direita de ratos. A substância F (Subst. F 12 mg/kg) foi injetada subcutaneamente meia hora antes da carragenina (500 μg/100μl/animal). Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela substância F, quando comparada com o grupo controle, foi de 6%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

5.9.2 Formulação de ibuprofeno 20%

Formulações mucoadesivas contendo em sua composição 20% de ibuprofeno foram administrados topicamente no local onde foi administrado o agente flogogênico, carragenina.

A formulação contendo 20% de ibuprofeno foi avaliada tanto nas patas traseiras quando na região oral. A espessura na primeira hora na região oral teve uma inibição em relação ao controle de 5% (Figura 59) enquanto que na pata, na terceira hora, a inibição foi de 2% (Figura 62), ambas não significativas em relação ao grupo controle.

Ao se avaliar o exsudato de ambas regiões observou-se que na região oral nos primeiros quinze minutos houve uma redução do extravasamento de 11% (Figura 60), e após a primeira hora, de 6% (Figura 61). Já a região subplantar das patas traseiras apresentou uma redução do extravasamento nos primeiros trinta minutos em 6% e após a terceira hora de 10%, Figuras 63 e 64 respectivamente, sendo em todas as situações não significativas em relação ao grupo controle (carragenina).

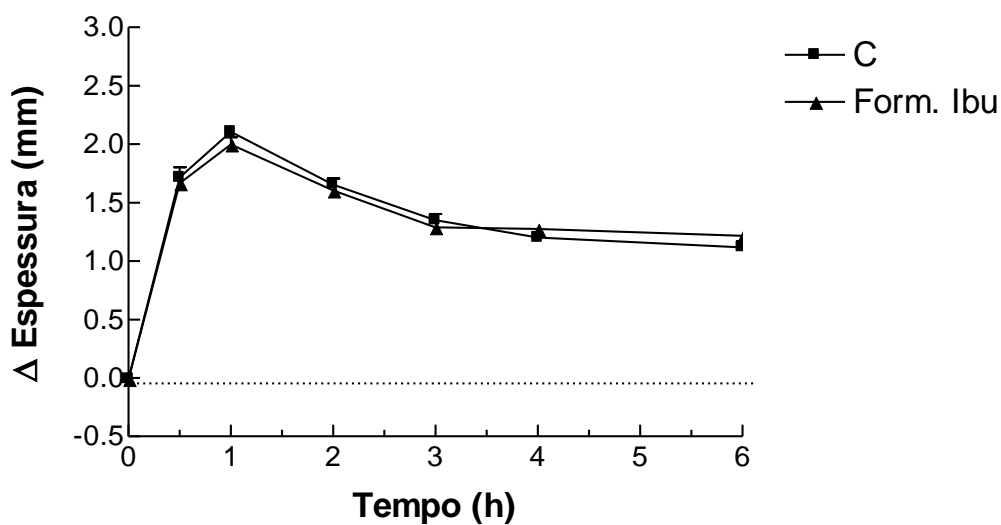


Figura 59: Efeito da formulação de ibuprofeno sobre o edema induzido pela carragenina na região oral direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrada topicamente no momento da administração da carragenina (500 µg/100µl/animal), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela formulação de ibuprofeno 20% na primeira hora foi de 5% quando comparada com o grupo controle. Os dados são apresentados como média ± SEM da diferença de espessura (edema) entre a região oral direita e a esquerda nos diferentes grupos de animais. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-11$.

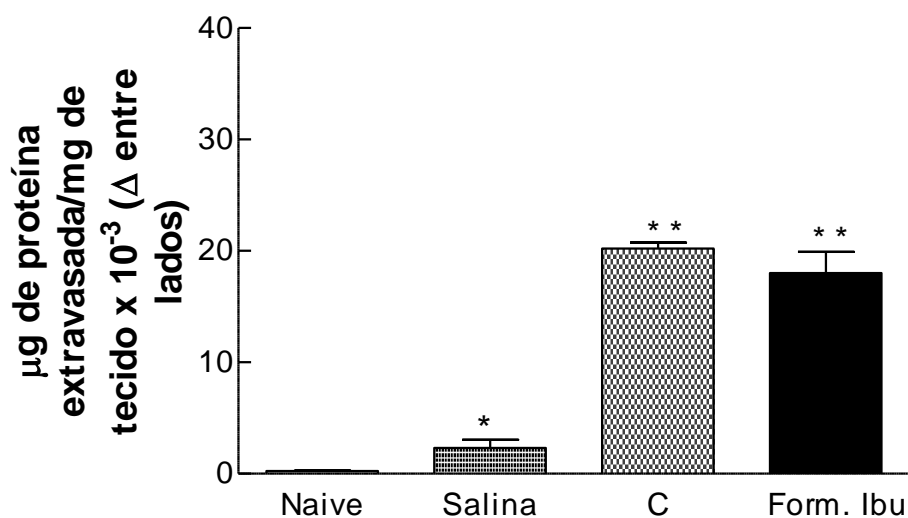


Figura 60: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans aos quinze minutos da indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrado topicamente no momento da administração da carragenina (500 µg/100µl/animal), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100µl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da µg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela formulação de ibuprofeno 20%, quando comparada com o grupo controle, foi de 11%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

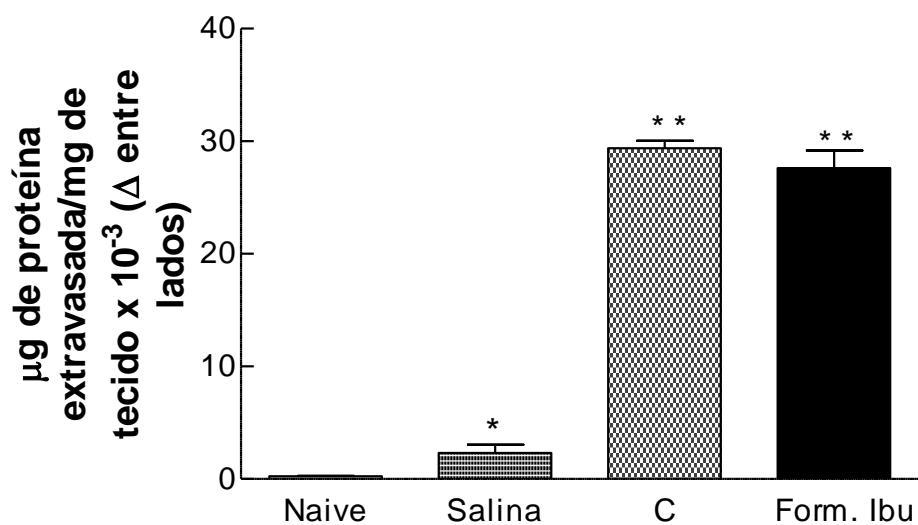


Figura 61: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans na primeira hora após a indução de edema pela carragenina na região oral direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrado topicamente no momento da administração da carragenina (500 μg/100μl/animal), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a região oral direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela formulação de ibuprofeno 20%, quando comparada com o grupo controle, foi de 6%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

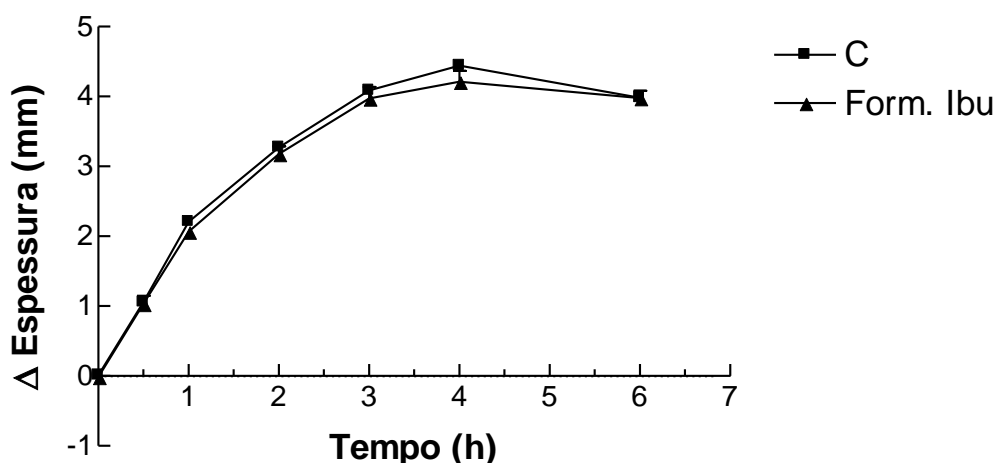


Figura 62: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o edema induzido pela carragenina na pata direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrado topicamente no momento da administração da carragenina (500 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{animal}$), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica e em seguida a pata foi envolta em fita crepe. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril no mesmo tempo e carragenina na zero hora. A inibição de edema pela formulação de ibuprofeno 20% na terceira hora foi de 2% quando comparada com o grupo controle. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística ($p < 0,05$) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. $n = 5-8$.

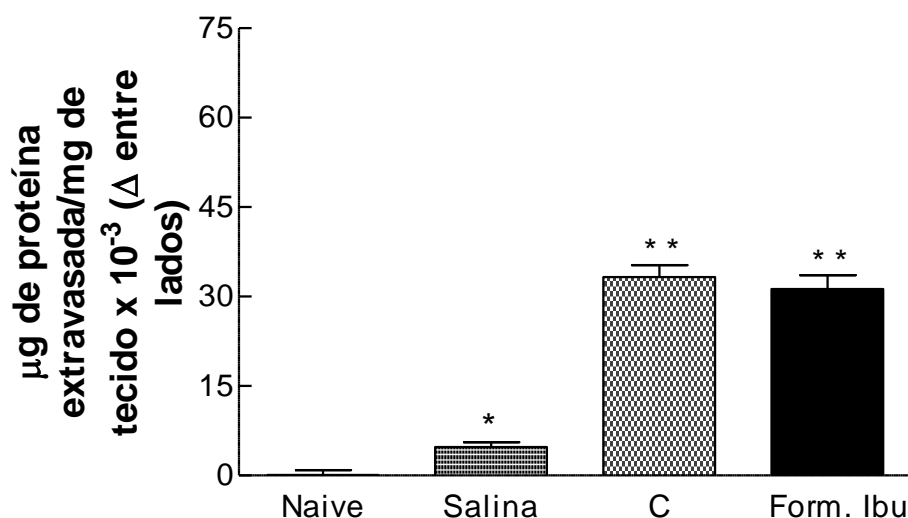


Figura 63: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans aos trinta minutos da indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrado topicamente no momento da administração da carragenina (500 μg/100μl/animal), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica e em seguida a pata foi envolta em fita crepe. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela formulação de ibuprofeno 20%, quando comparada com o grupo controle, foi de 6%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

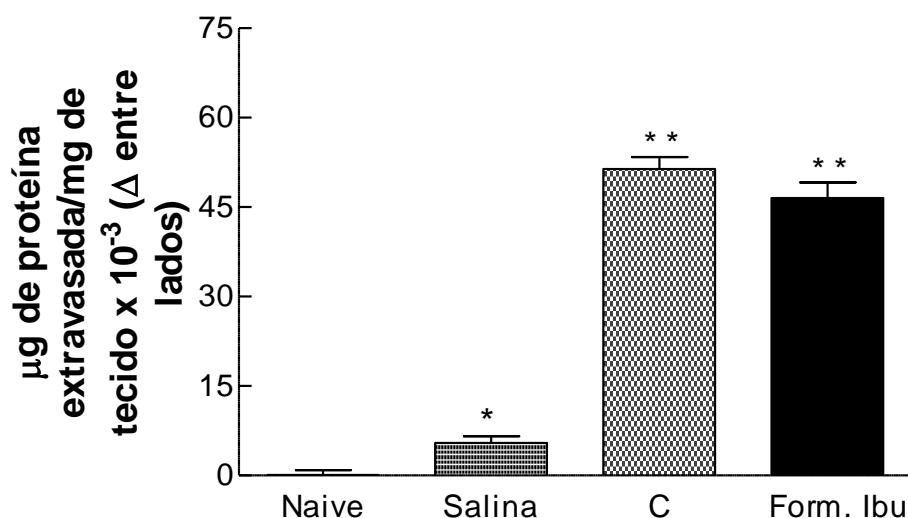


Figura 64: Efeito da formulação de ibuprofeno 20% sobre o extravasamento de Azul de Evans na terceira hora após a indução de edema pela carragenina na pata direita de ratos. A formulação de ibuprofeno 20% (Form. Ibu) foi administrado topicamente no momento da administração da carragenina (500 μg/100μl/animal), para uma melhor aderência, o adesivo foi umedecido com salina fisiológica e em seguida a pata foi envolta em fita crepe. Os animais do grupo controle (C) receberam salina fisiológica estéril (100μl/animal) no mesmo tempo e carragenina na zero hora. O corante azul de Evans foi diluído em salina fisiológica estéril e administrado intravenosamente na concentração de 2,5% (p/v), 15 minutos antes da administração de CG. Os dados são apresentados como média ± SEM da μg de proteína extravasada/ mg de tecido entre a pata direita e esquerda nos diferentes grupos de animais. A inibição do edema pela formulação de ibuprofeno 20%, quando comparada com o grupo controle, foi de 10%. Os símbolos * e ** indicam a diferença estatística (p<0,05) do grupo assinalado para os grupos: naive e salina, respectivamente. A análise estatística realizada foi segundo o teste de Bonferroni. n= 5-8.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de inflamação aguda na boca para o estudo da ação local de drogas antiinflamatórias.

Para verificar as características desse modelo de inflamação, houve a necessidade de compará-lo com outro modelo já estabelecido, e aceito como padrão no estudo de drogas antiinflamatórias novas e antigas.

Dentre os vários métodos descritos para avaliar drogas antiinflamatórias, uma das técnicas mais comumente empregada é a indução de edema nas patas traseiras de ratos. Até 1962, eram usados como agentes flogísticos o extrato de fermentação fungica, formalina, albumina do ovo, caolina, nistatina, dentre outros. Entretanto, segundo pesquisadores da época como LORENS (1961) afirmavam que a reprodutividade e especificidade de seus experimentos eram baixas, ocorrendo a redução do edema não só por drogas antiinflamatórias. Além disso, o uso de doses muito altas das drogas era necessário para serem estudadas, não sendo possível obter uma curva dose-resposta. Foi quando WINTER *et al.* (1962), embasados nos trabalhos de GARDNER (1960) que induzia artrite a partir de um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondrus crispus*, denominada carragenina, utilizaram-na com sucesso pela primeira vez como um agente edematogênico agudo.

Desde então, a carragenina vem sendo amplamente utilizada. E com o objetivo de entender a ação do polissacarídeo sulfatado no organismo, VINEGAR *et al.*, em 1987, descreveram que o processo inflamatório ocorria em 43 etapas, com a participação de diferentes mediadores inflamatórios relacionados com a ação edematogênica.

Com base nesses estudos e outros mais (ZANIN & FERREIRA, 1978; RANDALL & SELITTO, 1957), hoje são conhecidas, detalhadamente, diferentes metodologias de ensaios pré-clínicos. Entretanto, uma análise criteriosa dos métodos e a seleção do modelo mais indicado para avaliação da ação de drogas AINES foi realizada em 1996, por MUKHERJEE

et al., que concluíram que a indução de edema pela carragenina nas patas traseiras de ratos é o melhor modelo entre os ensaios pré-clínicos utilizados, sendo dessa forma hoje considerado como o modelo preditivo para drogas AINES com atividade potencial no ser humano, podendo assim ser considerado o Padrão-Ouro. Por esse motivo, esse modelo serviu como base na elaboração do novo modelo de edema na região oral além de servir como modelo controle para o estudo da ação de todas as drogas testadas, utilizado em paralelo no presente estudo.

A importância do novo modelo de edema em tecido mucoso desenvolvido nesse trabalho se dá uma vez que a inflamação é uma resposta complexa do tecido vivo e vascularizado a estímulos lesivos, sendo freqüentemente associada à dor e envolvendo eventos como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido granulomatoso (ANDRADE *et al.*, 2007), enfim, um efeito complexo e generalizado. Especialmente porque os ensaios *in vitro* são incapazes de reproduzir os processos fisiológicos envolvidos sistemicamente.

Outro ponto a se ressaltar é que devido ao grande número de patologias que acometem a região oral, como gengivites, periodontites, estomatites, etc, o uso tópico de drogas tem se tornado cada vez mais freqüente. Uma vez que o seu uso no local da inflamação permite uma redução da quantidade de droga a ser administrada no tecido e conseqüentemente a minimização dos efeitos colaterais sistêmicos (SALAMAT MILLER *et al.*, 2005), com a vantagem adicional da ausência de inativação, conseqüente ao efeito de primeira passagem a nível hepático (RANG & DALE, 2007). Entretanto, a avaliação dos efeitos do fármaco bem como o tempo de aderência dos mucoadesivos são avaliados por ensaios realizados *in vitro* ou *ex vivo* no qual o pesquisador tenta reproduzir algumas características da droga que deseja estudar, demonstrando uma ação local, e para uma

avaliação sistêmica são necessário então, voluntários como foi exposto no trabalho de PERIOLI *et al.*, em 2004.

Diante dessas necessidades, desenvolvemos um modelo de edema na região oral e para isso, primeiramente foi necessário avaliar a ação da carragenina na região interna (mucosa) da boca, sendo então obtida uma curva dose-resposta, processo esse semelhante ao edema de pata realizado em paralelo e semelhante a dados já publicados anteriormente na literatura (WINTER *et al.*, 1962; VINEGAR *et al.*, 1987). Entretanto, surpreendentemente diferente do perfil das patas traseiras, a espessura máxima da região oral ocorreu na primeira hora e em seguida houve a regressão gradativa do volume ao longo das seis horas subseqüentes, período esse que as medições ocorreram.

Ao se comparar ambos modelos, observamos também que uma mesma concentração do agente edematogênico, 10 mg/ml, injetada em ambas áreas a expansão da espessura nas patas traseiras é 57% maior em relação à expansão que ocorre na região oral. Outro resultado, obtido durante os experimentos, é que após diminuir 10 vezes a concentração de carragenina, passando de 2,5 mg/ml para 0,25 mg/ml, a redução da expansão máxima do edema na boca foi de 15% enquanto que na pata foi de 58%, sendo mais de 3 vezes a variação de espessura para a mesma quantidade de droga administrada. Essa “resistência” do tecido é confirmada ao analisar a inclinação da “Curva log dose-resposta” apresentando a região oral uma redução de quase 5 vezes em relação expansão tecidual apresentada pelas patas traseiras. O que nos levou a questionar se o tecido da região oral apresentaria maior dificuldade de expansão ou se a drenagem vascular da região seria mais eficiente do que a da pata.

No entanto, o edema de boca induzido pela carragenina apresenta a sua latência para o aparecimento da resposta já na primeira hora, sendo assim, 3 vezes mais rápido que nas patas traseiras, podendo esse modelo ser uma alternativa mais veloz para a avaliação

do potencial antiinflamatório de novas drogas (ORTOLANI *et al.*, 2011), uma vez que como já afirmado anteriormente, o modelo de edema na pata de ratos induzido pela carragenina é contudo o melhor modelo para prever a atividade anti-inflamatória de drogas do grupo da aspirina (MUKHERJEE *et al.*, 1996).

Devido à restrição na expansão da região interna da boca, a região externa também foi estudada. Para isso, carragenina na mesma concentração foi administrada também na região externa, e ao se comparar ambas regiões, a interna apresentou uma expansão 12% maior do que a externa, sendo dessa forma a região interna escolhida para a continuidade dos estudos. A diferença de expansão entre as regiões pode ser devido ao local que ocorreu a incisão da agulha, que a epiderme externa apresenta uma maior proporção de queratinócitos que por sua vez é responsável pela liberação de mediadores

Como mencionando anteriormente o novo modelo de edema atinge o seu volume máximo na primeira hora e após esse período ocorreria a sua regressão. O que é intrigante, pois como descrito por VINEGAR *et al.*, (1987), o edema induzido pela carragenina nas patas traseiras se caracteriza por apresentar três fases sendo a primeira (0-90 min) conduzida pela liberação de histamina e serotonina, seguida por uma segunda fase com duração de 60 min. quando há, predominantemente, a liberação de bradicinina. E após 150 minutos da administração de carragenina, estabelece-se a terceira fase, sustentada pela liberação de metabólitos do ácido araquidônico, principalmente prostaglandinas, proporcionando dessa forma o aumento de espessura da pata até a terceira e quarta horas. Após esse período, a reversão do quadro inflamatório até o décimo quinto dia pode ser observado (VINEGAR *et al.*, 1987). O que nos leva a acreditar que no processo inflamatório observado na região oral, outros fatores atuem além daqueles descritos para as patas traseiras.

Afinal, segundo o trabalho de GYÖRFI *et al.*(1992), nas inflamações das regiões do palato, mucosa oral, gengiva e periodonto há uma importante participação de processos neurogênicos na formação da inflamação.

A inflamação neurogênica decorre da liberação de neuropeptídeos como a substância P e do CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que provoca vasodilatação, além de potencializar a resposta inflamatória de outros mediadores como substância P (SP), bradicinina e histamina (GAMSE & SARIA, 1985; GAZELIUS *et al.*, 1987; CRUWYS *et al.*, 1992; KARIMIAN & FERRELL, 1994; BRAIN *et al.*, 1985; BRAIN & WILLIAMS, 1985). O CGRP pode também ser liberado quando ocorre a vasodilatação, seguida do extravasamento de plasma, processos esses originados por estímulos da região periférica espinhal ou pelo nervo trigêmeo (ESCOTT *et al.*, 1995; GAZELIUS *et al.*, 1987; HOLZER, 1988). A estimulação nervosa na cavidade oral é passível de ocorrer, uma vez que fibras nervosas imunoreativas a CGRP de origem trigeminal podem ser localizadas em toda mucosa endotelial da orofaringe, incluindo a submucosa perivascular palatal e subendotélio, lamina própria, papilas gustativas e glândulas (RODRIGO *et al.*, 1985; SILVERMAN & KRUGER, 1989; KATO *et al.*, 1998), bem como o endotélio juncional da gengiva (BYES *et al.*, 1987; NAGATA *et al.*, 1992), na polpa dental (UDDMAN *et al.*, 1986) e glândula submandibular (SOINILA *et al.*, 1989). Em humanos, a imunoreatividade ao CGRP na cavidade oral tem sido encontrada nas fibras neuronais e/ou terminais no subendotélio e áreas perivasculars da mucosa oral (HILLIGES *et al.*, 1994; FANTINI *et al.*, 1995), no endotélio basal (LUTHMAN *et al.*, 1988).

Com base nesses estudos sobre a região oral, é possível que após o estímulo pelo agente flogogênico utilizado em nosso modelo experimental, iniciou-se tanto o processo edematogênico causado pela carragenina, como uma resposta inflamatória neurogênica causada por terminações nervosas presentes no local. A junção desses processos podem ter potencializado a liberação local de mediadores inflamatórios, como a bradicinina e

histamina, levando o tecido a atingir a sua espessura máxima ainda na primeira hora do processo inflamatório, atingindo o auge da capacidade de extensão do tecido.

Por se conhecer os processos envolvidos na inflamação gerada pela carragenina e a fim de entender a ação dos mediadores presentes na fase inicial do processo inflamatório observado no novo modelo, administrou-se o pizotifeno, um antagonista de serotonina e inibidor dos receptores H_1 da histamina, e separadamente, pirilamina, um antagonista dos receptores H_1 da histamina, sendo que ambos foram capazes de antagonizar os efeitos edematogênico da serotonina e da histamina havendo uma redução na primeira hora de 70% do edema, mostrando que o edema formado na região oral inicialmente deriva da ação tanto da serotonina quanto da histamina. Dessa forma, confirmando a descrição por DI ROSA *et al.* (1972), em que a carragenina ao induzir a inflamação em sua primeira fase (0-90 minutos) tem a ação principalmente da serotonina e histamina, dados esses confirmados em trabalhos posteriores como AL-HABOUBI & ZEITLIN (1983) e FRANCISCHI *et al.* (1996).

A ação das prostaglandinas também pode ser observada no edema da cavidade oral, já na primeira hora, uma vez que antiinflamatórios inibidores seletivos (celecoxibe) e não seletivos (indometacina e ibuprofeno) de ciclooxigenases foram capazes de conter o quadro edematogênico com uma inibição média em torno de 60% do volume medido. Se considerarmos apenas o quadro inflamatório gerado pela carragenina, no qual segundo DI ROSA *et al.*, (1972) a ação das prostaglandinas ocorre apenas após 150 minutos de sua indução, seria surpreendente uma ação eficiente dos antiinflamatórios em questão no edema de boca já na primeira hora de injeção. Entretanto, a COX-1 está presente na maioria das células como uma enzima constitutiva produtora de prostanóides, que por sua vez atuam como reguladores homeostáticos (FUNK *et al.*, 1991; KARGMAN *et al.*, 1996), de forma que administração de seus inibidores ocasionaria a sua inibição contendo o processo inflamatório. Enquanto, que a COX-2 apesar de ter a sua expressão constitutiva em apenas

alguns tecidos, como no sistema nervoso central e nos rins (FITZGERALD, 2002), ela também apresenta sua expressão aumentada principalmente durante processos inflamatórios e transformação celular (BAKHLE & BOTTING, 1996; SEIBERT *et al.*, 1994; SANO *et al.*, 1992; FOSSLEIN, 1998), e caso haja realmente a inflamação neurogênica na cavidade oral, a mesma poderia acentuar a atividade dos mediadores inflamatórios.

O processo inflamatório deve ser controlado, caso contrário, pode ocorrer lesão tecidual, desenvolver-se inflamação crônica, cicatrizes e fibroses. Entretanto, o entendimento da resolução da resposta inflamatória é atualmente uma área de intensa investigação. Sabe-se que mediadores pró-resolução da inflamação derivados dos ácidos graxos como lipoxina, resolvina, protectina e maresina presentes no local da inflamação, podem controlar tanto a duração quanto a magnitude da inflamação aguda bem como o retorno da homeostasia (SERHAN, 2010).

Em um estudo de 2006, HASTURK *et al.*, utilizando um modelo experimental de doença periodontal, mostraram que o tratamento tópico com resolvina E1 (RvE1) reduziu o infiltrado leucocitário e a inflamação induzida por *Porphyromonas gingivalis*. Em seguida 2007, CAMPBELL *et al.*, ao estudarem as células da mucosa epitelial demonstraram que a ativação do receptor para RvE1 no PMN diminui a sua migração transendotelial, e no epitélio promove a expressão de CD55 (proteína de membrana, reguladora do complemento), diminuindo ainda mais a adesão e promovendo uma maior renovação dos PMN na região proporcionando uma resolução inflamatória ativa.

Confrontando esses dados com a descrição do processo inflamatório da carragenina descrito por VINEGAR *et al.*, 1987, o período entre 60 a 240 minutos é o momento no qual há uma formação ativa do edema, havendo dessa forma uma grande ação e permanência dos neutrófilos na região. Processo semelhante poderia estar ocorrendo no tecido oral o que promoveria a permanência da espessura medida. Entretanto, estudos vêm mostrando a

ação das RvE1, que possivelmente além de diminuírem a migração transendotelial dos neutrófilos não estimulam a sua permanência promovendo dessa forma uma rápida resolução do processo inflamatório gerado no local sendo uma das possíveis causas da rápida reversão da inflamação gerada pelo agente edematogênico no modelo de edema de boca, aqui apresentado.

Uma outra característica importante da região oral é que as mucosas possuem fatores de proteção subepitelial como a microcirculação extremamente ativa. O alto fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e removem substâncias tóxicas (WALLACE, 2001). Além do que, nas superfícies epiteliais da mucosa da boca existem sistemas imunes especializados, conhecidos coletivamente como tecidos linfóides associados à mucosa (MALT). As células epiteliais dessas superfícies são dispersas em uma densa rede de células dendríticas, responsáveis pela captura de antígenos no local e da inflamação e sua apresentação a pequenos linfócitos migratórios (JANEWAY *et al.*, 2002). Podendo dessa forma, contribuir para uma remoção mais rápida da carragenina no local e fazendo com que o estímulo edematogênico dure um período menor do que o descrito anteriormente por WINTER *et al.*, em 1962, nas patas traseiras de ratos.

Outra possibilidade a ser considerada talvez seja a alta velocidade de renovação do tecido mucoso oral em relação ao tecido das patas traseiras. Em 1994, KVIDERA & MACKENZIE demonstraram que a mucosa oral apresenta uma renovação tecidual, o “clearance” maior do que a pele. Sendo que a mucosa oral apresenta uma renovação do extrato córneo entre 22 a 35 horas, enquanto que na epiderme essa renovação varia de 5 a 8 dias. Essa renovação acelerada na mucosa oral seria, segundo os autores, uma forma de defesa e proteção contra o ataque e adesão de microorganismos à superfície epitelial, dificultando dessa forma uma colonização bacteriana e contribuindo para a rápida substituição do tecido injuriado.

Enfim, o modelo apresentado mostrou reatividade do tecido mucoso oral à carragenina, tendo-se produzido edema de maneira dose-dependente. Importante, a variabilidade entre as medidas durante a inflamação foram muito mais reduzidas, não sendo tão expressivas quanto à apresentada pelo modelo de edema de pata. Apesar de o edema de boca, em sua expansão máxima, ter sido pequeno em relação ao edema da pata, às mesmas doses de carragenina, isso não comprometeu a avaliação da ação de drogas antiinflamatórias, mostrando-se esse modelo tão sensível quanto o modelo considerado Padrão-Ouro (edema de pata). Possibilitando, inclusive, confirmar a ação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina e eicosanóides no quadro inflamatório gerado pela carragenina na cavidade oral. O que torna possível afirmar que, como o modelo nas patas traseiras, o modelo de boca também é um modelo de inflamação aguda, sendo capaz de detectar eficazmente a ação de drogas antiinflamatórias já consagradas no mercado. Sendo ainda vantajosamente, um modelo mais rápido desse/para esse tipo de diagnóstico, apresentando o resultado em uma hora, além de acessível financeiramente, por necessitar como instrumento de medida apenas o paquímetro.

Com base nessas conclusões, utilizamos o novo modelo de edema na avaliação de novas drogas e formulações desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa. O primeiro composto a ser estudado foi a droga denominada substância F, na concentração de 12 mg/kg. Observamos que em ambos modelos, a inibição do edema da carragenina pela substância F foi menor que 10%, sugerindo que ou a dose utilizada da substância F foi insuficiente para alterar o edema da carragenina, ou alternativamente, a substância F apresente apenas atividade antinociceptiva. Entretanto, mais doses da substância F terão de ser utilizadas nesse novo modelo para afirmar uma eventual ausência de atividade antiinflamatória.

Outro experimento desenvolvido ao longo do trabalho foi a análise de um mucoadesivo, desenvolvido pelo projeto da FAPEMIG, número CBB-APQ-00541-08,

contendo em sua composição 20% de ibuprofeno. Apesar das formulações serem de um antiinflamatório cujo mecanismo de ação é conhecido, as mesmas não reduziram a formação do edema pela carragenina em ambos os modelos utilizados. Provavelmente porque as concentrações liberadas no local da inflamação não foram suficientes e assim, nenhuma atividade antiinflamatória foi detectada. Nesse sentido, a concentração do ibuprofeno no dispositivo também deveria ser aumentada. Além disso, a adesividade do dispositivo poderia ser melhorada, já que sua permanência na boca não ultrapassou o período de anestesia dos animais (aproximadamente 1 h de duração), além de existir a necessidade de estar sempre manipulando o animal para reposicionar o mucoadesivo no local da inflamação, visto que as várias amostras se soltavam facilmente com os movimentos involuntários do animal anestesiado.

Enfim, ao final desse trabalho foi possível obter um novo modelo experimental de medida de inflamação, que além de apresentar medidas reprodutíveis é um modelo que se desenvolve rapidamente, permitindo dessa forma uma rápida detecção de drogas com atividade antiinflamatórias.

7. CONCLUSÕES

—

- O edema de boca induzido pela carragenina se mostrou tão útil quanto e mais rápido para a detecção de drogas com atividade antiinflamatória, do que o edema de pata;
- O edema de boca induzido pela carragenina pode envolver um componente neurogênico adicional em sua fisiopatologia, diferente do modelo de pata traseira de ratos;
- Esse modelo pode, ainda, permitir os estudos sobre resolução do processo inflamatório, visto sua curta duração, quando comparado com o modelo de edema de pata;
- Entretanto, ainda são necessários maiores estudos dos mecanismos envolvidos nesse modelo.

REFERÊNCIAS

ALBELDA, S. M.; SMITH, C.W.; WARD, P.A.. Adhesion molecules and inflammation injury. *FASEB J.*, v.8, n.8, p. 504-512, 1994.

AL-HABOUBI, H.A. & ZEITLIN, I.J. Re-appraisal of the role of histamine in carrageenan-induced paw oedema. *Eur. J. Pharmacol., Amsterdam*, v. 88, n. 2-3, p. 169-176, 1983.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; CARVALHO, J.C.; BASTOS, J.K. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J. Ethnoph.* 109, p. 464-471, 2007.

ARYA, S.K., WONG-STAAAL, F. e GALLO, R.C. Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J Immunol*, v.133, n.1, p.273-276. 1984.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURCNUTTE, J.T. Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potencial agente. *J. Clin. Invest.*, v.52, n. 3, p. 741-744, 1993.

BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Med. Inflamm.* v. 5:p. 305-323. 1996.

BASU, B.; GARALA, K.; J.T.. Formulation and Evaluation of Pimozide Buccal Mucoadhesive Patche. *Int. J. Pharma. Sc. Nanotech.* v.2 n.4, p. 739-748, 2010.

BEICHE, F.; SCHEUERER, S.; BRUNE, K.; GEISSSLINGER, G.; GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regilation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, 390: 165-169, 1996.

BELVISI, M.G.; BROWN, J.T.; WICKS, S.; FOSTER, M.L. New glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio? *Pulm. Pharmacol. Ther.* v. 14, p. 221-227, 2001.

BEUTLER, B., KROCHIN, N., MILSARK, I.W., LUEDKE, C. e CERAMI, A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*, v.232, n.4753, p.977-980. 1986.

BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory edema induced by synergism between (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol.* v. 86: p. 855–860. 1985.

BRAIN, S.J.; MORRIS, H.; MACINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* v. 313:p. 54–56. 1985.

BRAWN, K.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases: treat and defense. *Acta physiol. Scand. Suppl.*, v.492, o.9-18, 1980.

BROOKS P, EMERY E, EVANS F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II. *Rheumat.*, v.38, p. 779-788, 1999.

BUNTING, S.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The prostacyclin-thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br. Med. Bull.*, 39, p. 271 - 276. 1983

BYERS, M.R.; MECIFI, K.B.; KIMBERLY, C.L. Numerous nerves with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity innervate junctional epithelium of rats. *Brain Res.* v. 419: p. 311–314. 1987.

CAMPBELL, E.L.; LOUIS, N.A.; TOMASSETTI, S.E.; CANNY, G.O.; ARITA, M.; SERHAN, C.N.; COLGAN, S.P. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.* v. 21(12):p. 3162-3170. 2007.

CARVALHO, W.A. Mecanismos de ação de drogas antiinflamatórias não-esteróides. II. Ações analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. *F Med.*100: p.111-122 1999.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances. *Rev Bras Anestesiol*; 54: 3: p. 448 – 446. 2004.

CENSAREK, P.; FREIDEL, K.; HOHLFELD, T.; SCHRÖR, K.; WEBER, A.A. Human cyclooxygenase-1b is not the elusive target of acetaminophen. *Eur J Pharmacol.* 3;551 (1-3): p. 50-53. 2006.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99 (21):p. 13926-13931. 2002.

CHIANELLI, M.; MATHER, S.J.; MARTIN-COMIN, J.; SIGNORE, A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: a review. *Nucl Med Commun.* May;18(5): p. 437-455. 1997.

CLARK, T.P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. *Vet Clin Small Anim.*, v.36, p.1061-1085, 2006.

COELHO, M.M.; SOUZA, G.E.P.; PELÁ, I.R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rat. *Am. J. Physiol.*, v.263, p. R423-R427. 1992.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.) *Patologia Estrutural e Funcional*. 6^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 44-78. 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Acute and Chronic Inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.) *Pathologic Basis of Disease*. 6^a ed. Philadelphia: J.B. Saunders Company Edition. p. 50-58. 1999.

CROFFORD, L. J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*, 24:p. 15-19. 1997.

CRUWYS, S.C.; KIDD, B.L.; MAPP, P.I.; WALSH, D.A.; BLAKE, D.R. The effects of calcitonin gene-related peptide on formation of intra-articular oedema by inflammatory mediators. *Br J Pharm*. v.107:p.116–119. 1992

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L.D.L.; RIBELA, M.T.C.P.; KEEBLE, J.E; COSTA, S.K.P.; MUSCARÁ, M.N. Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur. J. Pain*. v.13, n.8: p.812–819. 2009.

DEWITT, D. L.; SMITH, W. L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci*. v.85: p. 1412-1416. 1988.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. Mar 15;87(6): p. 2095-2147. 1996.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmac.*, v. 24, p. 89-102, 1972.

DIP, E. C.; PEREIRA, N. A.; FERNANDES, P. D. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta shott* in mice. *Toxicon*, v. 43, p. 729-735. 2004.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; Guptaum, R. A.; Simon, L. S. D.; Van De Puttee, L.B.A.; Lipskyf, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 12: p. 1063-1073. 1998.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics: II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 107: p. 385-393. 1953.

ESCOTT, K.J.; BEATTIE, D.T.; CONNOR, H.E.; BRAIN, S.D. Trigeminal ganglion stimulation increases facial skin blood flow in the rat: a major role for calcitonin gene-related peptide. *Brain Res*. v. 669 :p. 93–99. 1995.

FANTINI, F.; GIANNETTI, A.; BENASSI, L.; CATTANEO, V.; MAGNONI, C.; PINCELLI, C. Nerve growth factor receptor and neurochemical markers in human oral mucosa: an immunohistochemical study. *Dermat.* v. 190:p. 186–191. 1995.

FARSKY, S.H.P.; MELO, S.B.V. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. *Ver. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, v. 50, p. 80-89, 1995.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuroph.*, 41: p.1006-1012, 2001.

FERREIRA, S.H.; NG, K.K.; VANE, J.R. The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation. *Br. J. Pharm.*,v.49, n.3, p.543-553. 1973.

FITZGERALD, G.A. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am J Cardiol* v. 89:p. 26D-32D. 2002.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*, 345:p. 433-442. 2001.

FLOREY, H. W. The secretion of mucus and inflammation of mucous membranes. In *General Pathology*. Edited by H. W. Florey. Lloyd Luke: London. p.195-225. 1970.

FOSSLEIN, E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci* v.28: p. 67-81.1998.

FRANÇA, D.S.; FERREIRA-ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; RIBEIRO, M.C.; REZENDE, R.M.; BAKHLE, Y.S.; FRANCISCHI, J.N. Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclo-oxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan. *Neuroph.* v. 51(1) :p. 37-43. 2006.

FRANCISCHI, J.N.; CHAVES, C.T.; MOURA, A.C.; LIMA, A.S.; ROCHA, O.A.; FERREIRA-ALVES, D.L.; BAKHLE, Y.S. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol.* v. 137(6):p. 837-844. 2002.

FRANCISCHI, J.N.; DIAS, M.F.; ROCHA, O.A.; DE ABREU CASTRO, M.S.; KIYOMI FUNAYAMA TATSUO, M.A.; FARINELLI, P.; PACHECO, C.M.; FERREIRA-ALVES, D.L.; SIROIS, P. Pharmacological characterization of Sephadex-induced oedema in rat paws: predominant role of serotonin and platelet-activating factor. *Int Arch Allergy Immunol.* v. 109(4):p. 398-406. 1996.

FUNK, C.D.; FUNK, L.B.; KENNEDY, M.E.; PONG, A.S.; FITZGERALD, G.A. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* v. 5: p. 2304-2312. 1991.

GAMSE, R.; SARIA, A. Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by CGRP. *Eur J Pharmacol.* V. 114:p. 61–66. 1985.

GARDNER, D.L. Production of arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide caragheenin. *Ann. Rheum. Dis.* v. 19. P. 369-372. 1960.

GAZELIUS, B.; EDWALL, B.; OLGART, L.; LUNDBERG, J.; HOKFELT, T.; FISCHER, J. Vasodilatory effects and coexistence of CGRP and substance P in sensory nerves of cat dental pulp. *Acta Physiol Scand.* v. 30:p. 33–40. 1987.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Review. Cardio. Rev.* v. 32, p.720-732. 1996.

GIRAUDEL, J.M.; TOUTAIN, P.L.; LEES, P. Development of in vitro assays for the evaluation of cyclooxygenase inhibitors and predicting selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cats. *Am. J. of Vet. Res.* ,v. 66, p. 700-709. 2005.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* v. 55, n. 5, p. 662-675. 1994.

GYÖRFI, A.; FAZEKAS, Á.; ROSIVALL, L. Neurogenic inflammation and the oral mucosa. *J Clin Periodontol.* v. 19:p. 731–736. 1992.

HASTURK, H.; KANTARCI, A.; OHIRA, T.; ARITA, M.; EBRAHIMI, N.; CHIANG, N.; PETASIS, N.A.; LEVY, B.D.; SERHAN, C.N.; VAN DYKE, T.E. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J.* v. 20(2):p. 401-403. 2006.

HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J Pediatr*, v.82, n.5. 2006.

HILLIGES, M.; HELLMAN, M.; AHLSTRÖM, U.; JOHANSSON, O. Immunohistochemical studies of neurochemical markers in normal human buccal mucosa. *Histochemistry.* v. 101:p. 235–244. 1994.

HOLZER, P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* v. 24:p. 739–768. 1988.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* v. 46(2):p. 157-203.1994.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiology. Garland Publ. N.York, USA, 2002.

KARGMAN, S.; CHARLESON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.; EVANS, J.; O'NEILL, G. .Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroente.* v. 111,p. 445-454. 1996.

KARIMIAN, M.; FERRELL, W.R. Plasma protein extravasation into the rat knee joint induced by calcitonin gene-related peptide. *Neurosci Lett.* v.166:p. 39–42. 1994.

KATO, J.; UDDMAN, R.; SUNDLER, F.; KURISU, K. Immunohistochemical study of the innervation of the boundary area of the hard and soft palates of the rat. *Acta Anat.* v. 163: p. 92–98. 1998.

KING, J.N., DAWSON, J., ESSER, R.E., FUJIMOTO, R., KIMBLE, E.F., MANIARA, W., MARSHALL, P.J., O'BYRNE, L., QUADROS, E., TOUTAIN, P.L., LEE, P. Preclinical pharmacology of rofecoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *J Vet Pharmacol Therap,* v.32, p.1-17. 2009.

KIS, B.; SNIPES, J.A.; BUSIJA, D.W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct;315(1):p. 1-7. 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* v. 18:p. 412-416. 1959.

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R. W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ciclooxygenase homologue. *J Biol Chem,* v. 266:p. 12866-12872. 1991.

KULKARNI, S.K.; JAIN, N.K.; SINGH, A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* v. 22: p. 291-298. 2000.

KUMMER, C.L. & COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. *Rev Bras Anesthesiol*, v. 5, n. 4, 2002.

KVIDERA, A.; MACKENZIE, I.C. Rates for clearance of the epithelial surfaces of mouse oral mucosa and skin. *Epith Cell Biol*.v. 3: p. 175-180. 1994.

LEE, P., GIRAUDEL, J., LANDONI, M.F.,TOUTAIN, P.L. PK-PD integration and PK-PD modeling of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary species. *J. Vet Pharmacol. Therap.* v.27, p.491-502. 2004.

LORENZ, D. Appetite-depressant and motility--increasing effects of substituted phenylalkylamines. *Arch. Exp. Path. Phamakol.* v.241:p. 185-187. 1961.

LUTHMAN, J.; JOHANSSON, O.; AHLSTRÖM, U.; KVINT, S. Immunohistochemical studies of the neurochemical markers, CGRP, enkephalin, galanin, γ -MSH, NPY, PHI, proctolin, PTH, somatostatin, SP, VIP, tyrosine hydroxylase and neurofilament in nerves and cells of the human attached gingiva. *Arch Oral Biol.* v. 33: p. 149–158. 1988.

MALLET, C.; DAULHAC, L.; BONNEFONT, J.; LEDENT, C.; ETIENNE, M.; CHAPUY, E.; LIBERT, F.; ESCHALIER, A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain.* v. 139(1):p. 190-200. 2008.

MEALEY, K. Systemic absorption of topically administered drugs. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*,v. 22, n. 7, p. 649-655. 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-435. 2008.

MENEZES, J.S.; MUCIDA, D.S.; CARA, D.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; RUSSO, M.; VAZ, N.M.; DE FARIA, A.M. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol.* v.15(3): p. 447-455. 2003.

MILLAN, M.J. N-methyl-D-aspartate receptor-coupled glycineB receptors in the pathogenesis and treatment of schizophrenia: a critical review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* v.1(2): p.191-213. 2002.

MITCHELL, J.A.; EVANS, T.W. Cycloxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflam. Research, Suppl.* v. 2, p. S88-S92, 1998.

MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* v. 5:p. 75–86. 2006.

MUKHERJEE, A. , HALE, VG , BORGA, O.; STEIN, R. Predictability of the clinical potency of NSAIDs from the preclinical pharmacodynamics in rats. *Inflam. Research* , v. 45 , p. 531–540. 1996.

MURA, P.; CORTI, G.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; BRAGAGNI, M.. Development of mucoadhesive films for buccal administration of flufenamic acid: Effect of cyclodextrin complexation. *J Pharm Sci.* Jul;99(7):p. 3019-3029. 2010.

NAGATA, E.; KONDO, T.; AYASAKA, N.; NAKATA, M.; TANAKA, T. Immunohistochemical study of nerve fibres with substance P- or calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the junctional epithelium of developing rats. *Arch Oral Biol.* v. 37:p. 655–662. 1992.

OTTERNESS, I.G.; MOORE; P.F. Carrageenan foot edema test. *Methods Enzymol.*v. 162:p. 320-327.1988.

ORTOLANI, P.L.; BAKHLE, Y.S.; FRANCISCHI, J.N. A rapid and reliable model of oral oedema to screen for new anti-inflammatory drugs. Abstract in 10th World Congress on Inflammation.2011.

PACHECO, C.M.; QUEIROZ, C.M. JR, MALTOS, K.L.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; FRANCISCHI, J.N. Local opioids in a model of periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol.* v. 52(7):p. 677-683. 2007

PAIVA-LIMA, P. Estudo farmacológico da participação de receptores opióides, canabinóides e de componentes do citoesqueleto na hipoalgesia induzida pelo celecoxibe e drogas correlatas: comparação com a morfina. Tese UFMG. ICB. 188p. 2010.

PAPICH, M.G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals. *Vet Clin Small Anim*, v.38, p.1243-1266. 2008.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.*; v. 9: p. 62–70. 2009.

PRAUSNITZ, M.R. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 (5): p.581–587.2004.

QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; PACHECO, C.M.; FONSECA, A.H.; KLEIN, A.; CALIARI, M.V.; DE FRANCISCHI, J.N. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. *Mediators Inflamm.* 2009.

RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interaction. In BRAIN, S.D. (Ed.). *The handbook of immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation*. San Diego. Academic Press. p. 77-107. 1994.

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

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R. *Farmacologia*. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REZENDE, R.M.; PAIVA-LIMA, P; DOS REIS, W.G.; CAMÊLO, V.M.; BAKHLE, Y.S.; DE FRANCISCHI, J.N. Celecoxib induces tolerance in a model of peripheral inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology*.59v.6:p. 551-557. 2010.

RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U.; PADOVA, F. D.; SCHREIER, M.; BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB*, v.8, n.2, p. 217-225, 1994.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA-LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. Oxford: *Pergamon Press*, p. 1-47, 1972.

RODRIGO, J.; POLAK, J.M.; TERENCE, G.; CERVANTES, C.; GHATEI, M.A.; MULDERY, P.K.; BLOOM, S.R. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) - immunoreactive sensory and motor nerves of the mammalian palate. *Histochemistry*. v. 82:p. 67-74.1985.

SAFAIHY, H.; SAILER, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica* 63, p. 487-493. 1997.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON,T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 57. P. 1666-1691. 2005.

SALLAY K, SANAVI F, RING I, PHAM P, BEHLING UH, NOWOTNY A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*. v. 17, n.3,p. 263-274, 1982.

SANO, H.; HLA, T.; MAIER, J.A.; CROFFORD, L.J.; CASE, J.P.; MACIAG, T.; WILDER, R.L. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest*.v. 89: p. 97-108. 1992.

SCHIMMER, B. e PARKER, K. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In:

J. HARDMAN, L. LIMBIRD, P. MOLINOFF, R. RUDDON e A. GOODMAN GILMAN. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 9 ed., p.1459-1486. 1996.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 91:p. 12013-12017. 1994.

SERHAN CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol*. v. 177(4):p. 1576-1591. 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLVER-KINSKY,T.. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v.18,n.3, p.385-405. 2004.

SIEGEL, I.A.; IZUTSU, K.T.; WATSON E. Mechanisms of non-electrolyte penetration accross dog and rabbit oral mucosa *in vitro*, *Arch. Oral Biol.*, vol.26, p.357-36. 1981

SILVERMAN, J.D.; KRUGER, L. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures. *J Comp Neurol*. v. 280:p. 303–330. 1989

SNIPES, J.A.; KIS, B.; SHELNESS, G.S.; HEWTT, J.A.; BUSIJA, D.W. Clonning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in rat. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 313, p. 668-676. 2005

SNYDER, D.S.; UNANUE, E.R. Corticosteroids inhibit murine macrophage la expression and interleukin 1 production. *J Immunol*, v.129, n.5, p.1803-1805. 1982.

SOINILA, J.; SALO, A.; UNSITALO, H.; YANAIHARA, N.; HAPPOLE, O. CGRP-immunoreactive sensory nerve fibers in the submandibular gland of the rat. *Histochemistry*. v. 91:p. 455–460. 1989

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An Inflammatory Review of Glucocorticoid Actions in the CNS. *Brain Behav Immun*, v. 21, n. 3, p. 259–272. 2007.

SPINOSA, H.S., GÓRNIAC, S.L., BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 239-272. 2006.

SQUIER, C.A. The permeability of oral mucosa. *Crit. Reiews Oral Medicine*, v.2(1): p.12-32. 1991

SQUIER, C.A.; KREMER, M.J. Biology of oral mucosa e esophagus. J. Nat. Cancer Inst. *Monographs*. v.29. p. 7-15. 2001.

SUZUMURA, Y.; KAMEYAMA, Y.; MIZUTANI, M.; KATO, M.; KONDO, K.; MABUCHI, R. Long junctional epithelium produced by application of bacterial protease in rats. *J. Periodont. Res.* v. 24. P. 217-221. 1989.

UDDMAN, R.; GRUNDITZ, T.; SUNDLER, F. Calcitonin gene-related peptide: a sensory transmitter in dental pulps? *Scand J Dent Res*.v. 94:p. 219–224. 1986.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*,231: 232-235. 1971.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 38. p.97-120. 1998.

VAUGHAN, C.E.; VAN DEN BUUSE, M.; ROLAND, B.L. Brain dopamine D2 receptor mRNA levels are elevated in young spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Res.* v. 34(4):p. 199-205. 1999.

VAUGHAN, D.J.; SHINNER, G.; THORNTON, C.; BRUNNER, M.D. Effect of tramadol on electroencephalographic and auditory-evoked response variables during light anaesthesia. *Br J Anaesth.* v. 85(5):p. 705-707. 2000.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc., Washington*, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

WALKER, J.M.; HUANG, S.M. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther.* v. 95(2):p. 127-135. 2002.

WALLACE, J. L Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *American Journal of Medicine*, v. 110, n. 1A, p. 19S-23S, 2001.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenase: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* v.18, p.790-804. Review, 2004.

WEISSMANN, G. Inflammation: Historical Perspective. In GALLEN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. (Ed. *Inflammation*): *Basic Principles and Clinical Correlates*, New York: Raven Press, p. 5-10. 1992.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, COX-3 and future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, v.355, p. 646-648. 2000.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*v.111, p. 544-547, 1962.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* v. 111: p. 544-547.1962.

XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; RIKSON, R. L.; SIMMONS, D. L Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*, v. 88:p. 2692-2696. 1991.

YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K.I.; KAUFMANN, W.E.; BARNES, C.A.; WORLEY, P.F. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulations by synaptic activity and glucocorticoids. *Neurons.* v. 11:p. 371-386. 1993.

YEDGAR, S., KRIMSKY, M., COHEN, Y., FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword? *Trends Pharmacol Sci.*v.28, n.9, p.459-464, 2007.

ZANIN, M.T.; FERREIRA, S.H. Relationship between oedema and plasma exudation in rat paw carrageenin inflammation. *Agents Actions.* v. 8(6):p. 606-609.1978.

CHIANELLI, M.; MATHER, S. J.; MARTIN-COMIN, J.; SIGNORE, A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review. *Nucl. Med. Com.*, v.18, p. 437-455, 1997.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 118/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Indução de edema de boca em ratos como modelo de detecção de drogas anti-inflamatórias de ação local**", que tem como responsável(is) **Janetti Nogueira de Francischi**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 09/2009**.

Este certificado expira-se em **9/ 09/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 118/2009**, related to the project entitled "**Oedema in the rat mouth as a model to detect new anti-inflammatory drugs active locally**", under the supervisors of **Janetti Nogueira de Francischi**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 9, 2009**.

This certificate expires in **September 9, 2014**.

Belo Horizonte, 14 de Setembro de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

Tabela com as principais medidas e seus erros

Tratamento	Média ± SEM					
	EDEMA DE BOCA			EDEMA DE PATA		
	Tamanho/ Espessura de edema (mm)	µg de proteína extravasada/mg de tecido x 10 ⁻³		Tamanho/ Espessura de edema (mm)	µg de proteína extravasada/mg de tecido x 10 ⁻³	
	Tempo (h)			Tempo (h)		
	01:00	00:15	01:00	03:00	00:30	03:00
Controle	2,1 ±0,05	20,2 ±0,5	29,4 ±0,7	4,1 ±0,04	33,3 ±1,77	51,4 ±2,01
Indo (2mg/kg)	0,7 ±0,06	9,8 ±0,4	14,4 ±1,32	1,2 ±0,03	15,8 ±1,28	23,8 ±0,99
Inibição (%)	66	52	51	71	53	56
Dexa (1mg/kg)	0,7 ±0,05	8,0 ±0,5	13,7 ±0,5	1,2 ±0,15	16,8 ±0,89	22,5 ±1,15
Inibição (%)	68	60	53	70	50	56
CX (12mg/kg)	1,4 ±0,06	14,7 ±1,01	21,6 ±1,07	2,9 ±0,02	24,9 ±1,37	39,1 ±1,44
Inibição (%)	36	27	27	28	25	24
CX (30mg/kg)	0,6 ±0,03	7,1 ±0,55	13,7 ±0,84	0,97 ±0,03	15,7 ±0,78	21,2 ±1,25
Inibição (%)	70	65	53	76	53	59
Ibu (20mg/kg)	0,9 ±0,05	9,8 ±0,22	14,0 ±0,73	2,18 ±0,02	17,5 ±1,21	25,3 ±1,18
Inibição (%)	59	51	52	46	47	51
Subst F (12mg/kg)	1,9 ±0,18	17,1 ±2,78	26,4 ±1,98	3,79 ±0,13	32,1 ±2,08	48,2 ±2,20
Inibição (%)	9	15	10	7	4	6
Form. Ibu. 20%	1,9 ±0,06	18,0 ±1,91	27,6 ±1,59	3,99 ±0,16	31,3 ±2,79	46,5 ±3,69
Inibição (%)	5	11	6	2	6	10
Piri (10mg/kg)	0,6 ±0,05	4,2 ±0,22	17,9 ±1,76	3,86 ±0,25	9,1 ±0,57	42,1 ±3,04
Inibição (%)	70	79	30	5	73	18
Pizo (2mg/kg)	0,6 ±0,05	4,6 ±0,48	18,8 ±1,24	3,6 ±0,1	8,5 ±0,63	39,9 ±1,38
Inibição (%)	72	77	36	13	74	22