

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

**CLINDAMICINA INIBE A RESPOSTA NOCICEPTIVA EM MODELOS DE DORES  
AGUDA E CRÔNICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE  
MECANISMOS OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS**

**BELO HORIZONTE - MG**

**2017**

**FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

**CLINDAMICINA INIBE A RESPOSTA NOCICEPTIVA EM MODELOS DE DORES  
AGUDA E CRÔNICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE  
MECANISMOS OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Dr. Renes de Resende Machado  
Dr. Márcio de Matos Coelho

**BELO HORIZONTE - MG**

**2017**

R696c

Rodrigues, Felipe Fernandes.

Clindamicina inibe a resposta nociceptiva em modelos de dores aguda e crônica por meio da ativação de mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos / Felipe Fernandes Rodrigues. – 2017.

108 f.: il.

Orientadores: Renes de Resende Machado;

Márcio de Matos Coelho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Clindamicina – Teses. 2. Dor – Teses. 3. Nocicepção – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) – Teses. 6. Opioides – Teses. 7. Serotonina – Teses. I. Machado, Renes de Resende. II. Coelho, Márcio de Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



## FOLHA DE APROVAÇÃO

CLINDAMICINA INIBE A RESPOSTA NOCICEPTIVA EM MODELOS DE DORES AGUDA E CRÔNICA POR MEIO DA ATIVAÇÃO DE MECANISMOS OPIOIDÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS

**FELIPE FERNANDES RODRIGUES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

*Renes de Resende Machado*  
Prof. Renes de Resende Machado - Orientador  
UFMG

*Márcio de Matos Coelho*  
Prof. Márcio de Matos Coelho - Coorientador  
UFMG

*Caryne Margotto Bertollo*  
Profª. Caryne Margotto Bertollo  
UFMG

*Isabela da Costa César*  
Profª. Isabela da Costa César  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2017.

Dedico o grau de Mestre

Ao meus pais, Dimas e Lourdes, à minha avó, Elza, e às minhas irmãs, Gabriela e  
Débora.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me ajudado a chegar onde almejei.

À minha querida família e aos amigos que sempre estiveram ao meu lado apoiando minhas decisões e me dando força para continuar minha jornada.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Faculdade de Farmácia, que me concederam conhecimento e suporte para que esse trabalho fosse realizado.

Aos meus colegas de trabalho, por todos os momentos de ajuda e diversão que vivemos nestes últimos dois anos. Meu sincero agradecimento a Marcela Ísis, Ivo Ferraz, Franciele Goulart, Fábio Campos, Sarah Mendes, Hellen Rose, Carine Barbosa, Paulo Augusto, Marcela Bini e Carla Barbosa.

À Maria Adelaide Fernandes e ao José Batista Viturino, pelo apoio e pela cooperação, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Por fim, um agradecimento especial:

Palavras jamais serão suficientes para agradecer aos meus queridos orientadores, Renes de Resende Machado e Márcio de Matos Coelho. Ambos foram, além de excelentes orientadores atenciosos e educados, verdadeiros amigos que nunca exitaram em me ajudar nos momentos em que mais necessitei. Meu mais sincero e importante agradecimento é para vocês! Muito obrigado por tudo!

Ao CNPq, FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

*“O mistério gera curiosidade e a curiosidade é a base do desejo humano para compreender”.*

*Neil Armstrong*

## RESUMO

A clindamicina, um antibiótico pertencente ao grupo farmacológico das lincosamidas, é utilizada no tratamento de pacientes com pneumonia, osteomielite e infecções causadas por microrganismos gram negativos anaeróbios e gram positivos aeróbios e anaeróbios. Estudos recentes têm demonstrado que a clindamicina inibe a produção de alguns mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e prostaglandinas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da clindamicina em modelos de dores inflamatória e nociceptiva e de edema inflamatório em camundongos. Clindamicina (200 e 400 mg/kg, i.p.) reduziu o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos por carragenina (400  $\mu$ g/20  $\mu$ L, i.pl.) por até 6 h. Clindamicina (400 mg/kg, i.p.) inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. As doses de 200 e 400 mg/kg de clindamicina reduziram o edema de pata induzido por este estímulo durante todo o período de avaliação. No modelo de resposta nociceptiva induzida por calor (placa quente), somente a maior dose de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) induziu elevação da latência para apresentação do comportamento nociceptivo. Os tratamentos com clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg, i.p.), realizados no 1° e no 7° dia após a injeção de CFA (1 mg/ml, 20  $\mu$ L, i.pl.), reduziram o edema de pata e a alodínia mecânica por até 48 h. Clindamicina (400 mg/kg), administrada a cada 72 h, reduziu de forma marcante o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos por CFA. Clindamicina (400 mg/kg) reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  na pata dos animais que receberam injeção local de CFA, mas não de carragenina. A atividade motora dos animais não foi alterada pela administração de clindamicina. A atividade da clindamicina em modelo de dor nociceptiva induzida pelo calor foi atenuada pela administração prévia de naltrexona (5 e 10 mg/kg, i.p.) e ciproheptadina (5 e 10 mg/kg, p.o), mas não foi afetada pela administração de glibenclamida (20 e 40 mg/kg, p.o) ou AM251 (4 e 8 mg/kg, i.p.). Os resultados demonstram a atividade da clindamicina em modelos de dores nociceptiva, inflamatória aguda e inflamatória crônica, bem como em modelos de edema inflamatório agudo e crônico. Em modelo de inflamação crônica, as atividades antiedematogênica e antialodínica foram demonstradas mesmo após o estabelecimento da sensibilização e do edema de pata, provavelmente relacionadas com inibição da produção e/ou ação de mediadores inflamatórios. Os resultados



também indicam que a atividade antinociceptiva da clindamicina envolve a ativação de mecanismos serotoninérgicos e opioidérgicos. Esses achados indicam que a clindamicina possui potencial para ser reposicionada para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas.

Palavras chave: clindamicina, dor, nocicepção, inflamação, TNF- $\alpha$ , opioides, serotonina.

## ABSTRACT

Clindamycin is a lincosamide antibiotic used to treat patients with pneumonia, osteomyelitis and skin infections. It has been recently demonstrated that clindamycin inhibits TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and prostaglandins production. Thus, the present study aimed to investigate the activity of clindamycin in models of nociceptive and inflammatory pain and inflammatory edema in mice. Clindamycin (200 and 400 mg/kg, i.p.) inhibited the paw edema and mechanical allodynia induced by carrageenan (400  $\mu$ g/20  $\mu$ L, i.pl.) for at least 6 h. Clindamycin (200 and 400 mg/kg, i.p.) inhibited the paw edema induced by formaldehyde, while only the highest dose (400 mg/kg, i.p.) inhibited the second phase of the nociceptive response induced by this inflammatory stimulus. In the model of nociceptive response induced by heat (hot plate), only the highest dose (400 mg/kg, i.p.) increased the latency for the nociceptive behavior. Treatment with clindamycin (100, 200 and 400 mg/kg, i.p.), in the first and seventh day after injection of CFA (1 mg/mL, 20  $\mu$ l, i.pl.), reduced the paw edema and mechanical allodynia for at least 48 h. Administration of clindamycin (400 mg/kg), every 72 h, markedly reduced the paw edema and mechanical allodynia induced by CFA. Clindamycin (400 mg/kg, i.p.) reduced the concentration of TNF- $\alpha$  in the paw of animals that received an i.pl. injection of CFA, but not carrageenan. The motor activity of the animals was not affected by clindamycin. The activity of clindamycin in the model of nociceptive pain induced by heat was reduced by previous administration of naltrexone (5 e 10 mg/kg, i.p.) and ciproheptadine (5 e 10 mg/kg, *p.o.*), but not by glibenclamide (20 e 40 mg/kg, *p.o.*) and AM251 (4 e 8 mg/kg, i.p.). Concluding, the results demonstrate the activity of clindamycin in models of acute nociceptive and inflammatory pain, chronic inflammatory pain, as well as in models of acute and chronic inflammatory edema. In models of chronic inflammation, the antiallodynic and antiedematogenic activities were demonstrated even after the establishment of sensitization and paw edema. These activities are probably associated with inhibition of the production or action of inflammatory mediators. The results also indicate that opioidergic and serotonergic mechanisms may mediate the antinociceptive activity of clindamycin. Altogether, the results indicate that clindamycin may be further investigated aiming its repositioning in the treatment of patients with inflammatory and painful conditions.

Keywords: clindamycin, pain, nociception, inflammation, TNF- $\alpha$ , opioids, serotonin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular da clindamicina.....	31
<b>Figura 2:</b> Pletismômetro utilizado para a avaliação do edema de pata.....	42
<b>Figura 3:</b> Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica; aparato e forma da avaliação da alodínia.....	43
<b>Figura 4:</b> Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	44
<b>Figura 5:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	44
<b>Figura 6:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre o edema de pata induzido por formaldeído.....	44
<b>Figura 7:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina.....	45
<b>Figura 8:</b> Escala temporal de avaliação da resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por CFA.....	46
<b>Figura 9:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzidos por CFA.....	47
<b>Figura 10:</b> Escala temporal de avaliação da duração do efeito da clindamicina sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzidos por CFA.....	47
<b>Figura 11:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido por administrações repetidas de clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA.....	48
<b>Figura 12:</b> Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora.....	49

<b>Figura 13:</b> Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela clindamicina ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.....	49
<b>Figura 14:</b> Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.....	50
<b>Figura 15:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.....	50
<b>Figura 16:</b> Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina, após tratamento prévio com naltrexona, AM251, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a nocicepção induzida por calor.....	51
<b>Figura 17:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p., - 1 h) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzido por carragenina (400 µg, 20 µL, i.pl.).....	55
<b>Figura 18:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p., - 1 h) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por carragenina (400 µg, 20 µL, i.pl.).....	56
<b>Figura 19:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre o comportamento de lambida de pata induzido por formaldeído (0,92%, 20 µL, i.pl.).....	57
<b>Figura 20:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído (0,92%, 20 µL, i.pl.).....	58
<b>Figura 21:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg; i.p., -1 h), pela dipirona (DIP; 500 mg/kg, p.o., -1 h) ou veículo sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50° C).....	59
<b>Figura 22:</b> Pata normal e pata com edema no 7° dia após injeção de CFA.....	60

<b>Figura 23:</b> Limiar nociceptivo e volume da pata em camundongos após a administração intraplantar de salina estéril (veículo) ou CFA (1 mg/mL, 20 µL) na pata posterior direita.....	61
<b>Figura 24:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 1° dia após indução), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p., - 1 h) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por CFA (20 µL), no 1° dia após a indução por CFA.....	63
<b>Figura 25:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 1° dia após indução), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p.) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por CFA (20 µL).....	64
<b>Figura 26:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 7° dia após a indução), dexametasona (DEXA, 10 mg/kg, i. p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por CFA (20 µL) em camundongos.....	65
<b>Figura 27:</b> Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 7° dia após a indução), dexametasona (DEXA, 10 mg/kg, i. p.) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por CFA (20 µL).....	66
<b>Figura 28:</b> Avaliação da duração do efeito induzido pela clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica e edema de pata, induzidos por CFA (20 µL).....	68
<b>Figura 29:</b> Efeitos induzidos pela clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzido por CFA (20 µL) em camundongos, quando tratados no 7° e 10° dia após indução.....	69
<b>Figura 30 :</b> Efeito induzido pela clindamicina (C;100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), fenobarbital (50 mg/kg, p.o., - 1 h) ou veículo (V) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante.....	70

**Figura 31:** Efeito induzido pela naltrexona (N; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p.) em modelo de placa quente.....72

**Figura 32:** Efeito induzido pela ciproeptadina (5 ou 10 mg/kg, p.o.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (400 mg/kg, i. p.) em modelo de placa quente.....73

**Figura 33:** Efeito induzido pela glibenclamida (G; 20 ou 40 mg/kg, p.o.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p.) em modelo de placa quente.....74

**Figura 34 :** Efeito induzido pelo AM251 (AM; 4 ou 8 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p.) em modelo de placa quente.....75

**Figura 35:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400mg/kg, i. p., -1 h) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  na pata de animais coletada 4 h após a injeção de carragenina (Cg, 400  $\mu$ g, 20  $\mu$ L, i.pl.).....76

**Figura 36:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400mg/kg, i.p., -1 h ) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  na pata de animais. A clindamicina foi administrada 7 dias após a injeção de CFA (1 mg/kg, 20  $\mu$ L, i.pl.) 5 h antes da coleta do tecido.....76

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIES - Anti-inflamatório esteroide

AINEs - Anti-inflamatório não-esteroide

BSA - Albumina sérica bovina

CC - Família de quimiocina unidas por dois resíduos de cisteína

CFA - Adjuvante completo de Freund

COX - Ciclooxigenase

CXC - Família de quimiocina com dois resíduos de cisteína separados por um aminoácido

CXCL-1 - Chemokine (C-X-C motif) ligand 1

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

FDA - Food and Drug Administration

HSP65 - Proteína recombinante de *Mycobacterium tuberculosis*

IFN - Interferon

IL - Interleucina

i.p. - Intraperitoneal

i.pl - Intraplantar

NOD2 - Domínio de oligomerização por união de nucleotídeos que contém proteína 2

OPD - Ortofenilendiamina

PBS - Solução tampão fosfato

PG - prostaglandinas

*p.o.* - *Per os*

THP-1 - Células monocíticas humanas

TNF - Fator de necrose tumoral



TGF - Fator de crescimento transformador

TRP - Receptor de potencial transitório

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOR .....	17
1.2 DOR NOCICEPTIVA .....	19
1.3 DOR INFLAMATÓRIA .....	21
1.4 ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS EXPERIMENTAIS .....	25
1.5 FARMACOTERAPIA DA DOR E INFLAMAÇÃO .....	27
1.6 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS: CLINDAMICINA COMO POSSÍVEL AGENTE ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	36
4.2 DROGAS, FÁRMACOS E REAGENTES DIVERSOS .....	36
4.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES, SUSPENSÕES E EMULSÕES, VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E DOSES USADAS .....	38
4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA OU CFA.....	41
4.4 AVALIAÇÃO DA ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA POR CARRAGENINA OU CFA.....	42
4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA E EDEMATOGÊNICA INDUZIDA POR FORMALDEÍDO .....	43

4.6 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E O EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA .....	45
4.7 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA POR CFA .....	45
4.8 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E O EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CFA.....	46
4.9 AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DO EFEITO DA CLINDAMICINA NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA E EDEMA INDUZIDO POR CFA.....	46
4.10 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA POR ADMINISTRAÇÕES REPETIDAS NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA E EDEMA INDUZIDO POR CFA.....	48
4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA.....	48
4.12 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR CALOR .....	49
4.13 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS POR NALTREXONA, CIPROHEPTADINA, GLIBENCLAMIDA E AM251 SOBRE A ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA CLINDAMICINA.....	51
4.14 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF- $\alpha$ .....	51
4.14.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS .....	51
4.14.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TNF- $\alpha$ .....	52
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E O EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA .....	54

5.2 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR FORMALDEÍDO .....	57
5.3 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR CALOR .....	59
5.4 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA POR CFA.....	60
5.5 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A ALODÍNIA MECÂNICA E O EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CFA .....	62
5.6 AVALIAÇÃO DA DURAÇÃO DO EFEITO ANTIALODÍNICO E ANTIEDEMATOGÊNICO DA CLINDAMICINA NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA E EDEMA INDUZIDA POR CFA.....	67
5.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITO ANTIALODÍNICO E ANTIEDEMATOGÊNICO INDUZIDOS POR ADMINISTRAÇÕES REPETIDAS DE CLINDAMICINA NO MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA CRÔNICA E EDEMA INDUZIDA POR CFA.....	67
5.8 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE A ATIVIDADE MOTORA .....	70
5.9 EFEITOS INDUZIDOS PELA NALTREXONA, CIPROHEPTADINA, GLIBENCLAMIDA E AM251 SOBRE A ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA CLINDAMICINA .....	71
5.10 EFEITO INDUZIDO PELA CLINDAMICINA SOBRE CONCENTRAÇÃO DA CITOCINA TNF- $\alpha$ NO TECIDO DA PATA APÓS INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA OU CFA.....	75
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOR

Segundo a *International Association for the Study of Pain*, a dor é definida como uma “experiência desagradável a qual envolve aspectos sensoriais e emocionais, associada a uma lesão real ou potencial dos tecidos.” O papel fisiológico da dor é alertar o indivíduo sobre ameaças ao bem estar e à integridade do organismo. A exposição deste a estímulos potencialmente nocivos induz sensação desagradável, informando ao indivíduo sobre perigos frente a sua integridade (BURTON et al., 2016; KLAUMANN et al., 2008). Desta forma, a dor pode ser considerada um sintoma importante para a detecção e a avaliação de diversas doenças, bem como indução de comportamento de precaução (BURMA et al., 2016).

A dor possui causas diversas, podendo ocorrer após lesão tecidual, procedimentos cirúrgicos ou estar associada a condições crônicas como artrite e fibromialgia, entre outras (COX, 2010). Os fenômenos subjacentes à percepção do estímulo nocivo e ao relato da dor envolvem processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais tanto no sistema nervoso periférico (SNP) quanto no sistema nervoso central (SNC) (BASBAUM et al., 2009).

Em relação à duração, a sensação dolorosa pode ser classificada como aguda (geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado) ou crônica (originada por lesão ou doença) (LOESER & MELZACK, 1999).

A dor aguda está diretamente relacionada à lesão tissular e apresenta menor duração (COX, 2010). Após a lesão, os nociceptores ficam sensibilizados em decorrência da liberação de substâncias algogênicas, as quais levam a redução do limiar de ativação, explicando, assim, a sensibilização do local lesionado. A ativação excessiva e prolongada de vias neuronais, durante o a dor aguda, pode resultar no desenvolvimento de uma dor de caráter crônica. Esta geralmente está associada a processos inflamatórios ou infecciosos e queimaduras (SALLUM et al., 2012). A dor aguda apresenta uma função protetora, pois propicia o reparo do tecido pela criação de uma região de

hipersensibilidade em torno da área da lesão, minimizando os movimentos e ativando comportamentos de esquiva, o que contribui para acelerar a recuperação tecidual (BASBAUM & WOOLF, 1999).

Na prática clínica a dor aguda pode ser avaliada por uma escala referente à intensidade da dor. A escala numérica possui números de 0 a 10, sendo o primeiro representando “nenhuma” e o último, “dor extremamente intensa”. Já na escala verbal o paciente relata sua dor em diferentes intensidades, tais como nenhuma dor, dor leve, dor moderada, dor forte e dor insuportável (GÖRANSSON et al., 2016; ANDRADE et al., 2006).

Embora extensas investigações tenham sido realizadas ao longo das últimas décadas, os manejos farmacológico e não farmacológico da dor aguda ainda não são eficientes. Estima-se que cerca de 50% dos pacientes internados nos hospitais apresentem dores agudas. Além disso, 86% dos pacientes apresentam dor aguda após procedimentos cirúrgicos, sendo que deste grupo 43% descrevem sua dor como moderada, 24% como grave e 23% como extrema (PASCHIKIS & POTTER, 2015).

Por sua vez, a dor crônica é considerada um problema de saúde pública afetando grande parte da população em diferentes idades. Estima-se que a prevalência mundial seja de 25% (PARASCHIV-IONESCU et al., 2016).

A cronicidade da dor caracteriza-se pela persistência do sintoma além do período fisiológico de recuperação do tecido lesionado e possui uma duração superior a três meses (COX, 2010). De modo diferente da dor aguda, a dor crônica não está relacionada a sinais de alerta. A dor crônica é definida como um sintoma presente em processos patológicos crônicos como fibromialgia, síndrome do intestino irritável, síndrome dolorosa da bexiga, enxaqueca, lombalgia, entre outras (MAIXNER et al., 2016).

A presença constante da dor gera impactos negativos sobre o indivíduo acarretando em oscilações de humor, alteração na vida sexual, perda de sono, baixa autoestima, além de alterar relações familiares e profissionais (SALLUM et al., 2012).

A persistência da dor tem sido associada a um estado de amplificação da nocicepção, resultante de mecanismos periféricos ou centrais que se manifestem como hiperalgesia generalizada, decorrente de uma doença crônica.

Além disso, fatores genéticos, associados a infecções, lesões e estresse psicológico, podem tornar o indivíduo mais sensível à dor, colaborando, assim, para a persistência da sensação dolorosa constante (MAIXNER et al., 2016).

A avaliação da dor crônica é de suma importância, uma vez que documenta a localização da dor e a gravidade da condição dolorosa de modo a acompanhar o curso longitudinal da mesma. Um dos instrumentos utilizados para a avaliação de dor crônica é o Questionário de Dor McGill, o qual apresenta 20 grupos de palavras para que os pacientes possam selecionar as que descrevem melhor sua dor. Esse questionário possui subescalas capazes de diferenciar componentes afetivos, sensoriais e avaliativos da dor. É importante salientar que a avaliação da dor crônica requer uma análise multidimensional, o que torna o Questionário de Dor McGill importante, uma vez que é capaz de fornecer informações sobre a qualidade de percepção da dor (FILLINGIM et al., 2016).

## **1.2 DOR NOCICEPTIVA**

A nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos, resultando em uma sensação dolorosa. Desta forma, a dor nociceptiva é resultado da estimulação de nociceptores por fatores térmicos, químicos ou mecânicos, os quais levam a despolarização do neurônio gerando um potencial de ação e sua propagação ao longo de toda fibra (BASBAUM et al., 2009; WOOLF & SALTER, 2000).

Para que a informação nociva possa ser processada é necessária a participação do neurônio de primeira ordem, o qual projeta-se da periferia em direção a medula espinhal e ao tronco cerebral; neurônio de segunda ordem, ascendente pela medula espinhal; e do neurônio de terceira ordem, o qual projeta-se da medula espinhal em direção ao córtex cerebral (KLAUMANN et al., 2008; MESSLINGER, 1997).

Os neurônios de primeira ordem possuem terminações nervosas livres denominadas nociceptores, capazes de transmitir estímulos nocivos da periferia para a medula espinhal e diretamente ao tronco cerebral. Os nociceptores

podem ser estimulados diretamente por temperaturas extremas, distensão do tecido, bem como por lesões ou infecções que induzem a liberação local de mediadores químicos, como as prostaglandinas e citocinas (YI DAI, 2015; BASBAUM et al., 2009).

Os neurônios de primeira ordem são classificadas de acordo com seu grau de mielinização, velocidade de condução e diâmetro. As fibras A $\delta$  são mielinizadas, de diâmetro médio, as quais possuem velocidade de condução intermediária, modulando a dor aguda. As fibras podem ser classificadas em A $\delta$ -I e A $\delta$ -II. Ambas respondem de forma distinta a estímulos de calor intenso, sendo que as do tipo I são ativadas por temperaturas acima de 50°C e as do tipo II por temperaturas acima de 42°C. Embora as fibras A $\beta$  sejam também mielinizadas, diferem das fibras A $\delta$  por possuírem diâmetro maior e por apresentar uma velocidade de condução mais rápida. As fibras A $\beta$  respondem ao estímulo mecânico inócua, isto é, um leve toque. Diferentemente dessas, as fibras C são de diâmetro pequeno, não mielinizadas e apresentam velocidade de condução lenta. São responsáveis pela transmissão da dor difusa e lenta. Essas fibras nociceptivas são capazes de traduzir um estímulo nocivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor (AOKI et al., 2016; DJOUHRI, 2016; BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores terminam no corno dorsal da medula espinhal. Esses possuem conexões com neurônios do corno dorsal da medula que são de suma importância para o processamento da informação nociceptiva. Entre esses neurônios do corno dorsal, podem-se citar os interneurônios excitatórios e inibitórios; neurônios proprioespinhais, os quais estão envolvidos com a atividade reflexa; e neurônios de projeção, envolvidos na transmissão rostral através da medula espinhal em direção ao córtex (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010; KLAUMANN et al., 2008; DREWES, 2006).

A informação nociceptiva é conduzida por neurônios de projeção através das vias ascendentes. Estas inervam o tálamo, mesencéfalo, sistema límbico e a formação reticular. Tais centros nervosos são responsáveis pela localização da dor, bem como a interpretação de sua intensidade (KLAUMANN et al., 2008).



### 1.3 DOR INFLAMATÓRIA

A dor inflamatória é resultado da ação de mediadores inflamatórios que ativam e sensibilizam nociceptores, gerando sensação dolorosa. A inflamação pode ser definida como uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual, com o objetivo de se restabelecer a homeostasia (SAMAD et al., 2001). De modo geral, o processo inflamatório pode ser considerado um mecanismo de defesa que envolve uma série de eventos bioquímicos e celulares, tais como ativação enzimática, liberação de mediadores, sensibilização, lise e reparo tecidual (MCMAHON et al., 2015; BASBAUM et al., 2009; MEDZHITOV, 2008).

A inflamação pode manifestar-se como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda persiste por um curto período de tempo podendo ter duração de até alguns dias e tem por características exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), migração celular e sensibilização ou ativação dos nociceptores, entre outras. Essa resposta pode ser causada por trauma mecânico, alterações imunológicas ou genéticas, agentes químicos e microrganismos (BASBAUM et al., 2009; MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Logo após a injúria tecidual, uma classe de receptores do sistema imune inato, receptores do tipo Toll, reconhecem padrões associados a danos e a diversos tipos de patógenos. Tais estruturas estão presentes na membrana plasmática ou em estruturas endossomais de leucócitos (DUFFY & O'REILLY, 2016). O reconhecimento inicial de infecção ou injúria tecidual é mediado pelos receptores do tipo Toll presentes em macrófagos e monócitos residentes no tecido, os quais levarão à produção de uma série de mediadores inflamatórios, entre os quais as quimiocinas (MEDZHITOV, 2008). Estas são proteínas pequenas com propriedades quimiotáticas de modo a atuar na manutenção da homeostasia da circulação dos leucócitos, além de recrutá-los para os locais específicos da lesão tecidual a fim de se iniciar o processo inflamatório e, posteriormente, reparo (ATRETKHANY et al., 2016). Quando liberadas por células endoteliais ou células parênquimais, as quimiocinas se ligam a receptores de quimiocinas acoplados a proteína G (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3, CXCR4 e CX3CR1), nos leucócitos, de modo a induzir uma cascata de

sinalização intracelular, levando a interação da célula com proteínas integrinas conduzindo a adesão dos leucócitos e, posteriormente, a sua transmigração. Uma vez nos tecidos, as quimiocinas coordenam a migração dos leucócitos diretamente ao sítio inflamatório (VIOLA & LUSTER, 2008).

O endotélio vascular permite o extravasamento de neutrófilos, leucócitos predominantes na inflamação aguda, mas não dos eritrócitos. Este fato é justificado pela ligação das integrinas, presentes nas células endoteliais, com os receptores de quimiocinas presentes nos leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

Após chegar ao local lesionado ou infectado, os leucócitos liberam outros mediadores necessários para o desenvolvimento da inflamação, entre os quais, as interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF). Além dessa característica, esses mediadores estão envolvidos na atividade, proliferação e diferenciação dos leucócitos e regulam a atividade de outras citocinas. Estas, por sua vez, podem aumentar ou diminuir a resposta inflamatória, sendo classificadas como inflamatórias, entre as quais interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-7 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento transformador-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-1 $\beta$  é liberada, principalmente, por macrófagos, monócitos e células endoteliais. É sintetizada sob a forma de proteína inativa (Pro-IL-1 $\beta$ ) até ser metabolizada pela enzima caspase-1, formando, assim, um produto ativo. Além disso, a IL-1 $\beta$  é capaz de provocar uma inflamação sistêmica por ativar a ciclooxigenase-2 (COX-2), levando a formação de prostaglandina E2 (SHOUVAL et al., 2016; ZHANG & AN, 2007).

O TNF- $\alpha$  é sintetizado por monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, neurônios e células da glia. Essa citocina inflamatória possui afinidade por dois tipos de receptores: TNFR1, presente em neurônios, o qual está relacionado com maior efeito biológico desencadeado pelo TNF- $\alpha$ ; e TNFR2, presente em macrófagos e monócitos no gânglio da raiz dorsal, de modo a estimular a proliferação de linfócitos T. De modo geral, o TNF- $\alpha$  é capaz de auxiliar na coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, levar a produção de prostaglandina E2, além de estar envolvido na apoptose celular. No sistema nervoso periférico, essa citocina reduz o limiar para a ativação dos nociceptores do tipo C, de modo a provocar hiperalgesia. Além disso, leva ao

aumento da corrente iônica dos canais para sódio, nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal, através da ativação dos receptores TNFR1 e da proteína quinase ativada por mitógeno p38. Esta, após sofrer um processo de fosforilação, leva ao aumento da corrente iônica dos canais para sódio, contribuindo para a dor inflamatória (EL-TAHAN et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011; HUDMON et al., 2008).

A dor é um sintoma comum e importante no processo inflamatório. A dor inflamatória também tem função adaptativa e induz comportamentos de esquiva que favorecem a reparação (WOOLF, 2000). Diversos mediadores podem levar ao surgimento da dor inflamatória. As citocinas inflamatórias possuem a capacidade de ativar ou sensibilizar os nociceptores. IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são as primeiras citocinas a serem sintetizadas e liberadas após a lesão tecidual ou infecção (MCMAHON et al., 2015). A IL-1 $\beta$  estimula a liberação de substância P (mediador inflamatório), enquanto que o TNF- $\alpha$  provoca a produção desse mediador em gânglios simpáticos. Ambas citocinas ativam receptores B2 de bradicinina, levando, assim, à hiperalgesia inflamatória. A bradicinina pode induzir a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , citocinas que contribuem para a dor prolongada, devido à sensibilização neuronal constante (OLIVEIRA et al., 2011).

Simultaneamente a tal processo, mediadores lipídicos também são sintetizados. Um dos componentes da membrana celular são fosfolipídeos. Desta forma, quando o tecido sofre uma lesão ou é acometido por uma infecção e estas ações geram danos à membrana celular, a enzima fosfolipase A2 é ativada mediante ação das citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Tal enzima irá promover a clivagem dos fosfolipídeos e levar à formação do ácido araquidônico. Este, por sua vez, poderá sofrer a ação das enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase, o que levará a produção dos leucotrienos e dos prostanóides. Estes são constituídos por tromboxano A2 e de prostaglandinas tais como PGE2, PGD2, PGF2, PGI2) (KAWAHARA et al., 2015; HIRATA & NARUMIYA, 2012; OLIVEIRA et al., 2011).

Assim como as citocinas, as prostaglandinas sintetizadas endogenamente, estão envolvidas na manutenção e na persistência da inflamação. A prostaglandina E2 provoca vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade dos vasos, colaborando, assim,

para a formação do edema. Tanto na medula espinhal, quanto no tecido lesionado e/ou infectado, a prostaglandina E2 aumenta a sensibilização dos neurônios a estímulos químicos, térmicos e mecânicos, de modo a elevar a nocicepção (KAWAHARA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011).

Além das citocinas e prostanóides, outros mediadores estão envolvidos no processo inflamatório, agudo e crônico, exercendo funções variadas, que vão desde a sensibilização de nociceptores periféricos, gerando sensação dolorosa, ao aumento do calibre vascular e, conseqüentemente, do fluxo sanguíneo. Bradicinina, serotonina, histamina, glutamato, substância P, óxido nítrico, entre outros, são alguns desses exemplos (ASCASO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011; BASBAUM et al., 2009). Com a elevação da permeabilidade dos capilares e vênulas, provocada por tais mediadores, ocorre o extravasamento de líquido com elevada concentração de proteínas plasmáticas para o interstício, levando a formação do edema. Este é uma característica fundamental da inflamação e também pode ocorrer devido a um bloqueio venoso local, bloqueio do retorno linfático, anormalidades dos vasos linfáticos e trombose venosa. Quando instalado nos membros, o edema pode gerar limitações funcionais as quais variam de complexidade de acordo com a localização, o volume e a duração (ELLIS, 2016; CHEN et al., 2010; CORNISH et al., 2001).

Diferentemente da dor inflamatória aguda, a dor crônica manifesta-se por longo período de tempo, apresentando características diversificadas (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Quando a resposta inflamatória aguda não consegue exercer suas funções de reparo tecidual e/ou eliminação do microrganismo patogênico, o infiltrado de leucócitos se modifica, com predomínio de macrófagos e linfócitos T. O processo fagocitário constante exercido pelos macrófagos, frente ao antígeno, pode levar ao surgimento de granulomas e, ainda, necrose tecidual. A presença de microrganismos patogênicos persistentes pode desencadear uma resposta autoimune. Os autoanticorpos então envolvidos na patogênese de dor inflamatória crônica, como no caso do lúpus eritematoso sistêmico, contribuindo para a ocorrência de lesão tecidual e inflamação excessiva. Os autoanticorpos mudam o estado funcional de neurônios, levando a uma excitabilidade dos mesmos, gerando sensação dolorosa constante (MCMAHON et al., 2015; MEDZHITOV, 2008).

Outra doença inflamatória crônica autoimune é a artrite reumatoide. Esta é caracterizada por inflamação, hiperplasia sinovial, deformidade das cartilagens e ossos. Inicialmente, macrófagos e linfócitos migram para a membrana sinovial de modo a estabelecer um processo inflamatório (MCINNES & SCHETT, 2011). A produção de citocinas inflamatórias, também desempenha um papel importante na fisiopatologia da artrite reumatoide. O TNF- $\alpha$  está envolvido na adesão, expressão de quimiocinas, migração leucocitária, nocicepção, ativação de condrócitos, além de contribuir para o processo de erosão articular (MCINNES et al., 2016).

Lesões e doenças podem desencadear um quadro crônico de reação inflamatória no qual células do sistema imune liberam cada vez mais mediadores inflamatórios de modo a ativar e sensibilizar os nociceptores, podendo levar a um sistema realimentação da dor crônica, desencadeada por essa hipersensibilidade dos nociceptores (MCMAHON et al., 2015; MEDZHITOV, 2008).

#### **1.4 ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS EXPERIMENTAIS**

Em modelos experimentais utilizando animais, a inflamação é induzida, mediante a utilização de estímulos capazes de provocar uma reação inflamatória localizada. Os estímulos são capazes de sustentar essa reação por minutos, caracterizando uma inflamação aguda, ou por semanas, de modo a permitir avaliações em longo prazo. Carragenina, formaldeído e adjuvante completo de Freund são alguns desses exemplos (BURMA et al., 2016).

A carragenina é um polissacarídeo derivado de algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) capaz de desencadear um processo inflamatório agudo, além de apresentar pico de hiperalgesia após 2-3 h de sua administração (CHEEKAVOLU & MUNIAPPAN, 2016; LIU et al., 2015; HARGREAVES et al., 1988). Histamina, bradicinina, prostaglandinas, tromboxanos, óxido nítrico e interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são alguns dos mediadores formados logo após a injeção intraplantar de carragenina na pata de roedores, levando a formação de edema, eritema e hiperalgesia. Como efeito desse estímulo, um

aumento do número de neutrófilos no local da injeção é observado em decorrência da liberação da quimiocina CXCL-1 (VAZQUEZ et al., 2015; GODIN et al., 2014).

O formaldeído é uma substância produzida a partir do metanol, capaz de desencadear um processo inflamatório agudo localizado em modelo animal experimental (RAVAL et al., 2013; SEPEHRI et al., 2012; NAKAGAWA et al., 1999). Após a administração desse estímulo, mediadores são produzidos levando a vasodilatação e aumento da permeabilidade, colaborando para a formação do edema. Tais mediadores são exemplificados por substância P, histamina, serotonina, óxido nítrico, prostanóides e citocinas (GODIN et al., 2015). A literatura relata o aumento da citocina TNF- $\alpha$  no soro e tecido da pata de camundongos, após a injeção intraplantar de formaldeído, sendo essa citocina associada à dor inflamatória patológica (YAMATO et al., 2013). Além disso, a inflamação localizada, desencadeada pelo formaldeído, é caracterizada por uma elevação do número de leucócitos no local da injeção e pela proliferação e migração de fibroblastos (RAVAL et al., 2013; YAMATO et al., 2013).

O adjuvante completo de Freund (CFA) é uma solução antigênica a qual encontra-se emulsificada em óleo mineral e é caracterizada pela presença de micobactérias neutralizadas, normalmente *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*, suspensas na fase oleosa da solução. O CFA é classificado como o adjuvante completo, mas, também, existe o adjuvante incompleto de Freund, o qual possui a mesma composição do CFA com a exceção das micobactérias neutralizadas (BILLIAU & MATTHYS, 2001).

O desenvolvimento da inflamação causada pelos adjuvantes está intimamente relacionado com a presença do peptidoglicano na parede celular das micobactérias, podendo desencadear um processo inflamatório crônico doloroso, como artrite reumatoide. A indução de inflamação crônica pelo CFA, estimula a imunidade celular mediante a ativação de linfócitos T. Esta ativação é decorrente de um tipo de proteína a qual se encontra na parede bacteriana das micobactérias, chamada de HSP65. Tanto células T, quanto anticorpos reconhecem os epítomos desta proteína (HUANG et al., 2016; BILLIAU & MATTHYS, 2001).

Outro processo bioquímico envolvido na resposta inflamatória, induzida

por CFA, é o envolvimento do dipeptídeo muranil-N-glicosil com o domínio de oligomerização por união de nucleótidos que contém a proteína 2 (NOD2). O peptideoglicano das micobactérias presentes no adjuvante completo de Freund, contém o dipeptídeo-N-glicosil, o qual é ativado pela NOD2, induzindo um processo de sinalização intracelular, via proteína quinase, levando a expressão de genes os quais codificam respostas inflamatórias, sendo, estas, mediadas, em grande parte, por monócitos e macrófagos (BEHR & DIVANGAHI, 2015).

A literatura demonstra que camundongos imunizados pelo CFA aumentam, inicialmente, a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Dentro de cinco dias, outras citocinas são detectáveis, em maior concentração, como IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$ . Esta citocina, juntamente com IFN- $\gamma$ , desempenha um importante papel na ativação de macrófagos. Além disso, IFN- $\gamma$ , juntamente com IL-12, desempenha um papel de realimentação positiva de modo a estimularem respostas desencadeadas por linfócitos T. O TNF- $\alpha$  induz a produção de quimiocinas (CC e CXC) e outras citocinas, como a IL-6. Esta, por sua vez, estimula a produção de anticorpos, ativa linfócitos T e está relacionada ao desenvolvimento de doenças autoimunes (BILLIAU & MATTHYS, 2001).

## 1.5 FARMACOTERAPIA DA DOR E INFLAMAÇÃO

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) são os fármacos de escolha para o tratamento de pacientes com condições dolorosas leves a moderadas e apresentam atividades analgésica, antiedematogênica e antipirética. Embora esses fármacos sejam considerados inibidores da ciclooxigenase (COX), o que contribui para explicar as inibições da produção dos prostanóides, mecanismos adicionais podem contribuir para suas atividades. Com a ocorrência da inibição das enzimas COX-1 e COX-2, pelos AINEs, há uma redução da síntese de prostaglandinas, reduzindo o processo inflamatório. Alguns fármacos possuem maior seletividade por uma das isoformas da COX. Esse diferente grau de seletividade está relacionado com diferenças nas estruturas moleculares de tais fármacos. Todavia, a inibição da COX está associada a reações adversas cardiovasculares e lesões na mucosa gástrica, uma vez que as prostaglandinas

também estão envolvidas no controle da agregação plaquetária, pressão arterial e mecanismos de defesa da mucosa gástrica (WALTERS & WOESSNER, 2016; ARACHCHILLAGE & MAKRIS, 2015).

A farmacoterapia com anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) é empregada em doenças inflamatórias e autoimunes, como asma, dermatite atópica, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, entre outras. Dexametasona, prednisolona, metilprednisolona e hidrocortisona são os fármacos mais utilizados, apresentando boa biodisponibilidade oral. No que diz respeito ao uso destes fármacos em doenças inflamatórias crônicas, deve-se levar em consideração a meia-vida de eliminação dos mesmos, uma vez que os AIEs de longa duração apresentam maior probabilidade em causar reações adversas (DE BOSSCHER et al., 2010; BOUMPAS et al., 1993).

Os AIEs ligam-se a receptores proteicos denominados receptores de glicocorticoides, atuando como fatores de transcrição e alterando a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. Os AIEs também interagem com fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa B$ , de modo a inibir suas funções. Uma vez que o fator nuclear  $\kappa B$  atua na ativação da transcrição de genes responsáveis pela síntese de citocinas inflamatórias e prostanóides, como IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, entre outros, a inibição das suas funções contribui para atenuar o processo inflamatório (KANAZAWA et al., 2016; SONG et al., 2005; DE KLOET et al., 1993; WRIGHT et al., 1993). As reações adversas relacionadas com o uso de AIEs possuem relação com sua ação metabólica e com o uso crônico dos mesmos podendo levar a quadros clínicos como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, osteoporose, catarata, entre outras (FARDET et al., 2007; MORTIMER & TATTERSFIELD, 2005).

Outra alternativa terapêutica para o alívio da dor são os analgésicos opioides, utilizados para o alívio de dores moderadas a intensas, que geralmente não são aliviadas por meio do uso de AINEs. Morfina e codeína, entre outros, são alguns exemplos de fármacos pertencentes a esta classe (FARIDAALAEI et al., 2016; TOBIAS et al., 2016, MCCLEANE, 2007). Os analgésicos opioides interagem com os receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , acoplados à proteína G. Em decorrência desta interação, adenilato ciclase é inibida, resultando na redução da concentração de AMPc, abertura de canais para potássio e inibição de canais



para cálcio, de modo a reduzir a neurotransmissão, contribuindo, assim, para a analgesia (GENDRON et al., 2016; SATOH & MINAMI, 1995).

Embora os analgésicos opioides possuam eficácia relatada, o uso é limitado pelas reações adversas graves que podem induzir, tais como náuseas, vômitos, sedação, retenção urinária, constipação, depressão respiratória e risco de morte quando usados em altas doses. Além disso, os analgésicos opioides podem causar dependência e tolerância (CLARKE et al., 2016; SOLHI et al., 2016; PIZZI et al., 2012).

Apesar de existirem fármacos bastante eficazes para o tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias, as reações adversas causadas por esses fármacos restringem seu uso. Assim, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas é justificada.

## **1.6 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS: CLINDAMICINA COMO POSSÍVEL AGENTE ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO**

O desenvolvimento de novos fármacos para o mercado farmacêutico leva em torno de 15 anos, representando altos custos para as indústrias farmacêuticas. Em média, um fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado na clínica, tem um custo de total 800 milhões de dólares, ao longo de seus estudos que vão desde a síntese da molécula até a fase de farmacovigilância (CHONG & SULLIVAN, 2007).

O reposicionamento de fármacos, isto é, a investigação de novas funções para fármacos em uso, cujas informações sobre segurança e farmacocinética estejam consolidadas na literatura, apresenta-se como alternativa promissora, uma vez que reduzem o tempo e custo em estudos pré-clínicos e clínicos (BASTOS & COELHO, 2014; CHONG & SULLIVAN, 2007).

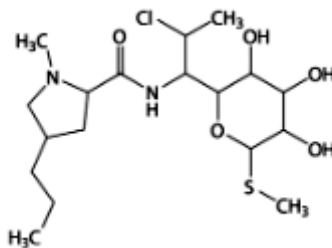
No que se diz respeito ao reposicionamento farmacológico, direcionado ao alívio de dor e inflamação, outras classes de fármacos já apresentam atividade, ou indícios, analgésica e/ou anti-inflamatória. Anticonvulsivantes como a carbamazepina possuem atividade antinociceptiva, por reduzir a hiperexcitabilidade neuronal, aliviando, assim, quadros de dor neuropática. A

literatura também relata o uso de antidepressivos tricíclicos no alívio da dor. A duloxetine é um fármaco aprovado para o alívio da fibromialgia e da dor neuropática. Amitríptilina e nortríptilina são utilizadas para o tratamento de doenças neuropáticas, artríticas, enxaqueca e câncer (BASTOS & COELHO, 2014).

Evidências das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de antibióticos também são relatadas. A ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração, inibe a nocicepção visceral em modelo de distensão colo retal e a alodinia em modelo experimental de constrição crônica de nervo (BASTOS & COELHO, 2014; HU et al., 2010). A rifampicina, fármaco antituberculoso, apresentou atividade antialodínica, em modelo experimental de constrição crônica de nervo, e efeito anti-inflamatório por inibir sinalização de receptores tipo Toll e reduzir a produção de mediadores inflamatórios provenientes de macrófagos (WANG et al., 2013).

Os antibióticos pertencentes a classe das tetraciclina, minociclina e doxiciclina, elevam o limar nociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática. Além disso, sabe-se que a minociclina inibe a produção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune. Quando administrada concomitantemente com ceftriaxona, a minociclina reduz a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Segundo a American College of Rheumatology, a minociclina é utilizada no tratamento de pacientes com artrite reumatoide e é considerada um fármaco modificador do curso da doença (BASTOS & COELHO, 2014; AMIN et al., 2012).

A clindamicina (Figura 1) é um antibiótico que pertence à classe farmacológica das lincosamidas. Seu mecanismo de ação bacteriostático está relacionado com a ligação à subunidade 50-S dos ribossomos bacterianos e consequente inibição da síntese de proteína. Durante esta, o RNA de transcrição transporta aminoácidos específicos para a cadeia polipeptídica da subunidade 50-S do ribossomo. Desta forma, a clindamicina liga-se a essa subunidade 50-S ribossomal de modo a impedir a síntese proteica, inibindo, assim, a reprodução dos microrganismos (BOOKSTAVER et al., 2015; MURPHY & MCKAY, 2015).



**Figura 1:** Estrutura molecular da clindamicina

A clindamicina é bem absorvida quando administrada pela via oral, podendo atingir até 90% de biodisponibilidade, e é distribuída para a maioria dos tecidos corporais, principalmente tecido ósseo. Além disso, há uma elevada taxa (92 a 94%) de ligação deste fármaco a proteínas plasmáticas. Seu tempo de meia vida é de 2-3 horas. O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização da clindamicina. Esta é metabolizada predominantemente pelo citocromo P450, através de CYP2A4 e CYP3A5, levando a formação de dois metabólitos: N-desmetilclindamicina e sulfóxido de clindamicina. Estes, por sua vez, são pouco quantificáveis no plasma humano, porém quantificáveis na bile e urina. Cerca de 10% de clindamicina é excretada na urina e 3,6% nas fezes (BOOKSTAVER et al., 2015; MURPHY & MCKAY, 2015; GONZALEZ et al., 2014; CARRASCO-PORTUGAL et al., 2008; WYNALDA et al., 2003).

A clindamicina é frequentemente utilizada para o tratamento de pacientes com pneumonia, osteomielite e infecções causadas por microrganismos gram negativos anaeróbios e gram positivos aeróbios e anaeróbios. Bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* (Grupos A, C e G) e organismos anaeróbios, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* e *Clostridium perfringens* apresentam sensibilidade à clindamicina (MURPHY & MCKAY, 2015; PINEDA & WATT, 2015). Entretanto, é relatada resistência adquirida a este fármaco pela espécie *Clostridium difficile*, o que inviabiliza o uso de clindamicina para o tratamento de pacientes com infecções causadas por esse microrganismo (LÓPEZ-UREÑA et al., 2016; MURPHY & MCKAY, 2015).

No mercado farmacêutico, a clindamicina foi, primeiramente, comercializada em duas formas farmacêuticas: oral e solução injetável. As doses destinadas a administração oral em adultos variam de 150 a 600 mg. Já para administração intravenosa e intramuscular, variam de 600 a 900 mg. Para o uso intravenoso, é

recomendada a diluição da solução de clindamicina em soro fisiológico ou ringer lactato e infusão por cerca de 30 minutos (OLIVEIRA, 2014; GIUGNO et al., 2013; CARRASCO-PORTUGAL et al., 2008). Entretanto, o uso sistêmico desse fármaco pode causar várias reações adversas relacionadas ao sistema gastrointestinal, incluindo anorexia, náuseas e vômitos. Cerca de 21% dos pacientes que fazem uso sistêmico de clindamicina desenvolvem diarreia e 10%, desenvolvem colite pseudomembranosa (MURPHY & MCKAY, 2015; RICHARDSON & HAMMERT, 2014). Tendo em vista essas considerações, foi desenvolvido o uso tópico de clindamicina, com o objetivo em elevar a adesão ao tratamento e reduzir reações adversas. Todavia, o uso tópico de clindamicina é eficaz somente em doenças dérmicas, como acnes vulgaris (NGUYEN & EICHENFIELD, 2015).

As ações da clindamicina no SNC têm sido relatadas. Em um modelo experimental de meningite bacteriana em coelhos, o tratamento com clindamicina induz um efeito neuroprotetor, em decorrência da diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, os quais são capazes de gerar danos neurais (BÖTTCHER et al., 2004). Antibióticos pertencentes a classe farmacológica das lincosamidas são capazes de interferir em mecanismos pré e pós-sinápticos da neurotransmissão, de modo a causar um bloqueio neuromuscular. Seus efeitos sobre a função neuronal ainda são incertos, mas há evidências de que esses antibióticos, em altas concentrações, podem vir a exercer ações anestésicas locais (AL AHDAL & BEVAN, 1995; KONOPKA & PARSONS, 1988). Entretanto, sabe-se que a clindamicina induz bloqueio de canais iônicos em um estado aberto e reduz a liberação de acetilcolina nos terminais dos neurônios motores (LEE et al., 2008).

Embora não haja estudos clínicos randomizados, há relato de que a combinação de clindamicina com tetraciclinas tem sido utilizada no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (SMITH et al., 2011).

Em diferentes modelos experimentais, tem sido demonstrada a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias pela clindamicina. Hirata e colaboradores (2001) investigaram o efeito induzido por esse fármaco em modelo experimental de choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Foi observada uma redução significativa das concentrações de

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no soro dos camundongos tratados com doses variando de 160 a 600 mg/kg. Em contrapartida, houve um aumento da concentração de IL-6 em relação ao grupo controle.

Com o objetivo de avaliar possível ação anti-inflamatória de antibióticos, incluindo a clindamicina, no tratamento de acne vulgaris, Kuwahara e colaboradores (2005) relatam que a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , por células mononucleares humanas do sangue periférico estimuladas por *Propionibacterium acnes*, tornam-se reduzidas quando tratadas com três diferentes concentrações (3, 10 e 30 mg / mL) de clindamicina. Sabe-se que *P. acnes* é capaz de induzir uma resposta inflamatória. A clindamicina inibe a resposta induzida por este microrganismo através da redução da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (NGUYEN & EICHENFIELD, 2015).

A clindamicina tem um papel fundamental na modulação da atividade de neutrófilos. Em indivíduos não portadores de sepsis bacteriana, mas que apresentam infecções desencadeadas por *Staphylococcus aureus*, a atividade fagocítica dos neutrófilos foi melhorada, assim como, a atividade antimicrobiana, quando os indivíduos foram previamente tratados com clindamicina (WITTMANN et al., 2004). Outro estudo avaliou os efeitos induzidos pela clindamicina, *in vitro* e *in vivo*, sobre a função de leucócitos polimorfonucleares em pacientes imunocomprometidos com e sem infecção. Esse estudo revelou que a clindamicina, em concentração de 2 mg/L, aumentou de forma significativa a função dos leucócitos polimorfonucleares. Em contrapartida, em concentrações mais elevadas, a função destas células não foi modificada e, em alguns casos, foi reduzida (SANTOS et al., 1992).

## 2 JUSTIFICATIVA

A dor é considerada um problema de saúde pública, com uma prevalência mundial média de 25% (PARASCHIV-IONESCU et al., 2016). No Brasil, há uma estimativa de que 19% da população sofrem de dores de caráter crônica de origens reumáticas, musculo esqueléticas, viscerais e neuropáticas (SENNA et al., 2004). Além disto, o número de pacientes que consultam serviços públicos de saúde e relatam dor tem sido cada vez mais constante. Este sintoma afeta de forma negativa a qualidade de vida dos pacientes. Estes podem apresentar depressão, dificuldade de concentração, sentimento de morte, afastamento social e alterações na dinâmica familiar, entre outros sintomas negativos (ELLIOTT et al., 1999).

Nas abordagens terapêuticas de dor, sabe-se que, embora existam fármacos empregados no alívio sintomático, ainda há limitações evidentes tanto em relação à eficácia quanto à segurança (FRANCISCHI et al., 2008). Em vista disto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas que sejam mais eficazes, tenham melhores perfis de segurança e sejam mais acessíveis. Diante deste contexto, a investigação da atividade da clindamicina em modelos experimentais de dores inflamatória e nociceptiva e de inflamação pode contribuir para identificação de novas abordagens farmacoterapêuticas úteis para o manejo de pacientes com diversas doenças as quais geram dores agudas e crônicas.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar as atividades da clindamicina em modelos experimentais de dores inflamatória e nociceptiva e de inflamações aguda e crônica, bem como investigar os possíveis mecanismos que medeiam essas atividades.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), machos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e acondicionados em salas com temperatura controlada ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ), correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 h com fornecimento de água e ração *ad libitum*. Durante os experimentos, foi realizada a retirada de ração 12 h antes do tratamento para os animais que receberam administração *per os* (*p.o.*) de fármacos. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos dois dias antes da realização dos experimentos. Após o término destes, os animais foram submetidos à eutanásia. Todos os experimentos realizados seguiram as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG, protocolo n° 25/2016).

### 4.2 Drogas, fármacos e reagentes diversos

- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA; Sigma-Aldrich, EUA): reagente para preparo da solução de extração de citocinas.
- Adjuvante completo de Freund (CFA) (Sigma-Aldrich, EUA): estímulo nocivo/inflamatório.
- Albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA): reagente usado no ensaio de ELISA.
- AM251 (Tocris, EUA): antagonista de receptores canabinoides CB1.
- Aprotinina (Sigma-Aldrich, EUA): inibidor de protease utilizado no preparo de solução de extração de citocinas.
- Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich, EUA): veículo utilizado no preparo das suspensões destinadas à administração *p.o.*



- Carragenina  $\lambda$  tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA): estímulo nocivo/inflamatório.
- Cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich, EUA): reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Cloridrato de ciproheptadina (Sigma-Aldrich, EUA): antagonista serotoninérgico.
- Cloridrato de naltrexona (Sigma-Aldrich, EUA): antagonista opioidérgico.
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v injetável (Equiplex, Brasil): veículo usado para o preparo das soluções ou suspensões de estímulos nocivos/inflamatórios.
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % p/v não injetável (Sanobiol, Brasil): veículo usado para preparo das suspensões de CMC.
- Dipirona sódica (Sanofi Aventis, Brasil): analgésico/antipirético.
- Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil): fármaco depressor do SNC.
- Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF; Sigma-Aldrich, EUA): reagente para preparo da solução de extração de citocinas.
- Formaldeído 0,92% (Sigma-Aldrich, EUA): estímulo nocivo/inflamatório.
- Fosfato de clindamicina (Nova Farma, Brasil): antibiótico.
- Fosfato de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA): anti-inflamatório esteroide.
- Glibenclamida (Sigma-Aldrich, EUA): bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes.
- Ortofenilenodiamina (OPD; Sigma, EUA): reagente usado no ensaio de ELISA.
- Peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil): reagente utilizado no ensaio de ELISA.
- Tween 20 (Sigma, EUA): reagente utilizado no ensaio de ELISA.

#### **4.2.1 Preparo das soluções, suspensões, emulsões, vias de administração e doses usadas**

##### **➤ Clindamicina**

A solução de clindamicina foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v estéril, imediatamente antes de cada administração intraperitoneal (i.p.). As doses de clindamicina usadas nos protocolos experimentais foram de 100, 200 e 400 mg/kg. A solução de clindamicina foi administrada pela via i.p. em um volume de 4 mL/kg.

##### **➤ Naltrexona e AM251**

A solução de naltrexona foi preparada imediatamente antes da administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A emulsão de AM251 foi preparada em cremofor 5% e álcool etílico 5% acrescentadas em solução de NaCl 0,9% p/v. As doses de naltrexona foram de 5 e 10 mg/kg e as doses de AM251 foram de 4 e 8 mg/kg. Ambos foram administrados por via i.p. em volume de 4 mL/kg.

##### **➤ Ciproheptadina e glibenclamida**

As suspensões foram preparadas imediatamente antes de cada administração em suspensão de CMC 0,5% p/v em cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de glibenclamida foram de 20 e 40 mg/kg e as doses de ciproheptadina foram de 5 e 10 mg/kg. As suspensões foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg.

##### **➤ Fenobarbital**

A solução de fenobarbital foi preparada pela diluição do medicamento em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. A dose utilizada foi de 50 mg/kg, *p.o.*, em volume de 10 mL/kg.

➤ **Dexametasona e dipirona**

As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de dipirona e dexametasona foram 500 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. As soluções foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg.

➤ **Solução tampão fosfato (PBS)**

Reagentes: 12 g de NaCl; 0,302 g de KCl; 1,725 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); 0,306 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Os reagentes foram dissolvidos em 1500 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4.

➤ **Solução tampão de lavagem**

Reagente: Tween 20 0,1% em tampão fosfato salino (PBS).

➤ **Solução tampão de bloqueio (BSA 1%)**

Reagente: 200 mg de BSA dissolvidos em 20 mL de PBS.

➤ **Solução diluente das amostras (BSA 0,1%)**

Reagente: 40 mg de BSA dissolvidos em 40 mL de PBS.

➤ **Solução tampão citrato**

Reagentes: 13,41 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 5,19 g de ácido cítrico. Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 5,0.

➤ **Solução do substrato OPD**

Reagentes: 4 mg de OPD e 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Os reagentes foram dissolvidos em 10 mL de solução tampão citrato.

➤ **Solução STOP**

Reagente: ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 M)

➤ **Solução diluente para a extração de citocinas**

Regentes: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,89 g de fosfato de sódio bibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Os reagentes foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

➤ **Solução para extração de citocinas:**

Reagentes: 2,34 g de NaCl, 50  $\mu\text{L}$  de Tween 20, 500 mg de BSA, 4,48 mg de cloreto de benzalcônio, 37,2 mg de EDTA, 2  $\mu\text{L}$  de aprotinina, 1,7 mg de PMSF (dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO). Os reagentes foram dissolvidos em 100 mL da solução diluente.

➤ **Estímulos inflamatórios**

• **Formaldeído**

A solução de formaldeído foi preparada em solução de NaCl 0,9% p/v na concentração de 0,92%, imediatamente antes de cada experimento. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  dessa solução por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos.

• **Carragenina**

A suspensão de carragenina 2% foi preparada em solução de NaCl 0,9% p/v. A suspensão foi preparada no dia anterior ao experimento e armazenada sob refrigeração. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  (400  $\mu\text{g}$  de carragenina) da suspensão por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos.

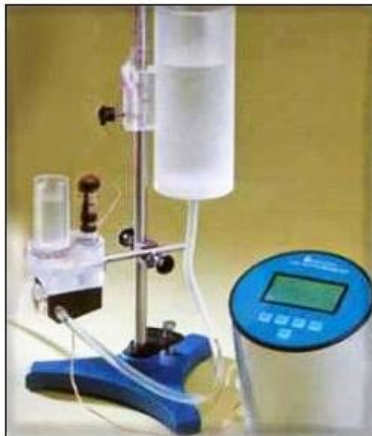
## • **CFA**

O CFA foi homogeneizado imediatamente antes da injeção. Foram injetados 20  $\mu$ L (1 mg/mL) de CFA por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos.

### **4.3 Avaliação do edema de pata induzido pela carragenina ou CFA**

O volume de pata dos animais foi avaliado através de um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Tal aparelho é composto por uma célula cilíndrica destinada a medição do volume de pata, preenchida com uma solução, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. A solução utilizada constitui-se de água destilada, cloreto de sódio 0,9% p/v e um tensoativo (detergente comum). Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula, onde a pata do animal é imersa, resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (Figura 2). Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital.

Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, o qual fixa o valor do volume observado. O volume de pata basal, de cada animal, foi avaliado no dia anterior ao experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os volumes de pata basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais. Foi realizada a injeção i.pl. de 20  $\mu$ L de carragenina (400  $\mu$ g) e o volume de pata foi avaliado 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo. A injeção de CFA foi realizada, via i.pl., em volume de 20  $\mu$ L (1 mg/mL) e o volume da pata foi avaliado 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72 e 96 h.



**Figura 2:** Pletismômetro utilizado para a avaliação do edema de pata.

#### **4.4 Avaliação da alodínia mecânica induzida pela carragenina ou CFA**

Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato em uma sessão diária de 60 min cada, durante dois dias antes da realização do experimento e em uma sessão de 10 min, imediatamente antes do experimento.

A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) (Figura 3A), o qual permite determinar o limiar para a retirada da pata, que é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada sobre o centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal (Figura 3B) e um aumento gradual de pressão foi feito até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão a qual fez com que o animal removesse a pata, foi registrado automaticamente. Para cada animal, foram feitas cinco avaliações em intervalos de 20 s, descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média das três medidas restantes.

O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia anterior ao teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes

grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados seis animais. Foi realizada a injeção i.pl. de 20  $\mu$ L de carragenina (400  $\mu$ g) e a alodínia mecânica foi avaliada 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo. A injeção de CFA foi realizada, via i.pl., em volume de 20  $\mu$ L (1 mg/mL) e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72 e 96 h.



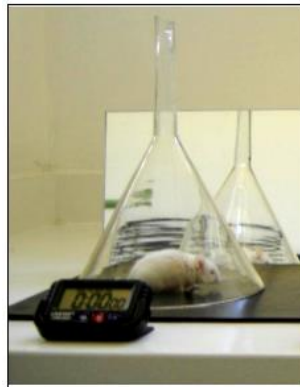
**Figura 3:** Analgesímetro digital utilizado para avaliação da alodínia mecânica (A); aparato e forma da avaliação da alodínia (B). PP - ponteira de polietileno; TF - transdutor de força. O sítio de estimulação é o centro delimitado pelos pontos pretos na pata.

#### **4.5 Avaliação das respostas nociceptiva e edematogênica induzidas por formaldeído**

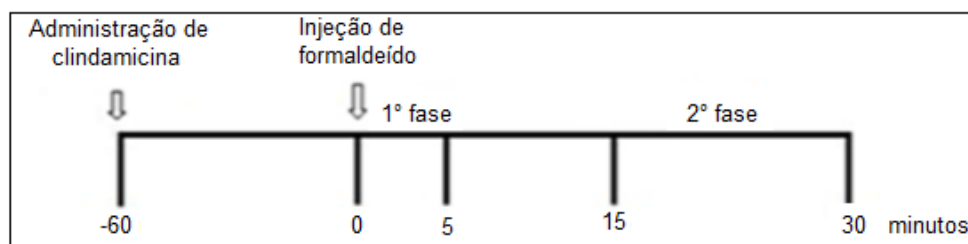
A avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído foi realizada conforme proposto por Tjølsen et al. (1992). Cada animal foi colocado sob um funil de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) para ambientação por cerca de 10 min, imediatamente antes da administração de formaldeído (Figura 4). A divisão dos grupos foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes, sendo utilizados sete animais para cada grupo experimental. A clindamicina foi administrada, pela via i.p., nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, 1 h antes da injeção de formaldeído (0,92%, i.pl.). A duração do comportamento de lambida após a injeção de formaldeído foi determinada nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que

correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente.

Em tal modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28°C) é de suma importância, uma vez que a duração do comportamento de lambida durante a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em uma temperatura inferior a 23°C (TJØLSEN et al., 1992). Os resultados foram expressos como o tempo durante o qual os animais apresentaram o comportamento de lambida da pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva. Posteriormente a essa avaliação, a atividade antiedematogênica da clindamicina foi avaliada nos tempos 30 min; 1,5 h e 2,5 h.



**Figura 4:** Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.



**Figura 5:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

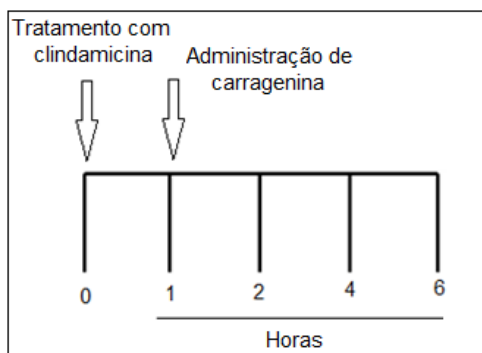




**Figura 6:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre o edema de pata induzido por formaldeído.

#### 4.6 Efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por carragenina

Os animais foram pré-tratados com três diferentes doses de clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg), pela via i.p., 1 h antes da injeção de carragenina (20  $\mu$ L). As avaliações de variação de volume da pata e limiar nociceptivo foram realizados nos tempos de 2, 4 e 6 h após a administração de clindamicina. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.

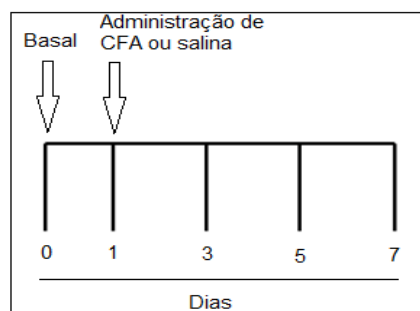


**Figura 7:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por carragenina.

#### 4.7 Padronização do modelo de dor inflamatória crônica induzida por CFA

Para padronização do modelo experimental utilizando camundongos, CFA (20  $\mu$ L) ou solução salina (20  $\mu$ L) foram injetados na pata posterior direita dos

animais. As avaliações do limiar nociceptivo e do volume de pata ocorreram a cada dois dias, até o 7º dia. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.



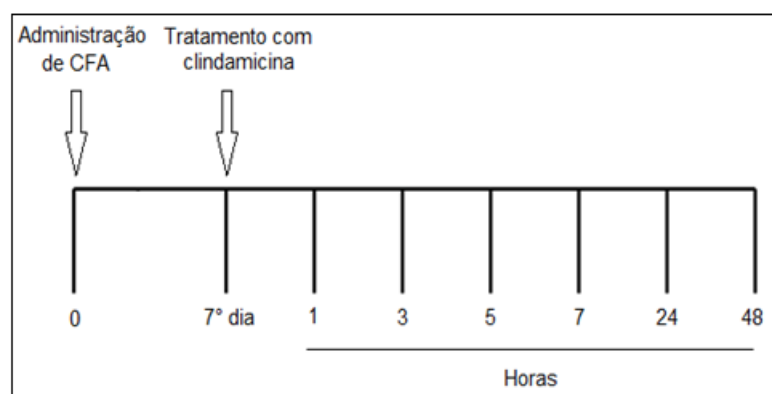
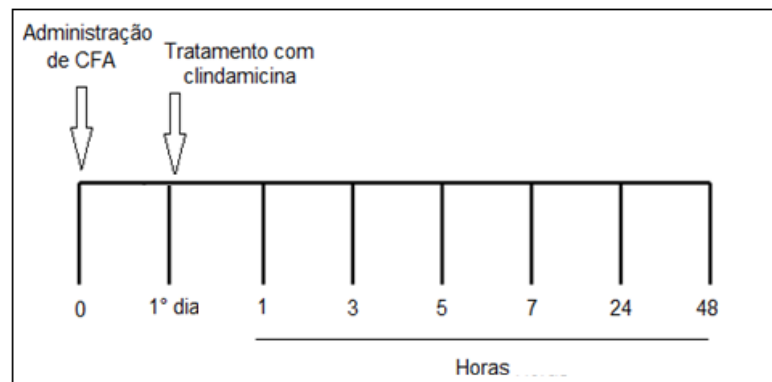
**Figura 8:** Escala temporal de avaliação da resposta nociceptiva e do edema de pata induzidos por CFA.

#### **4.8 Efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA**

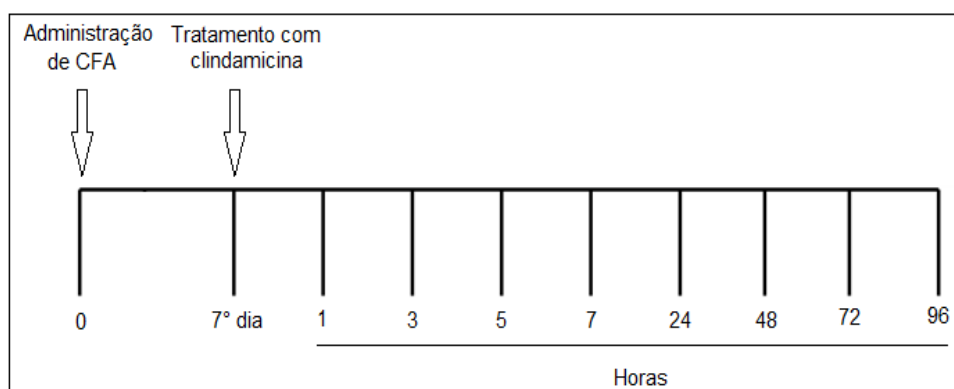
Os animais foram tratados com três diferentes doses de clindamicina (100, 200 e 400 mg/kg), pela via i.p., no 1º e 7º dia, em diferentes grupos, após a injeção de CFA (20 µL). As avaliações de variação de volume da pata e limiar nociceptivo foram realizados com o auxílio do pletismômetro e analgesímetro digital, respectivamente, nos tempos de 1, 3, 5, 7, 24 e 48 h após administração de clindamicina. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.

#### **4.9 Avaliação da duração do efeito induzido pela clindamicina no modelo de dor inflamatória crônica e edema induzido por CFA**

Os animais foram tratados com clindamicina (400 mg/kg), pela via i.p., no 7º dia após a injeção de CFA (20 µL). As avaliações de variação de volume da pata e limiar nociceptivo foram realizadas nos tempos de 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72 e 96 h após administração de clindamicina. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.



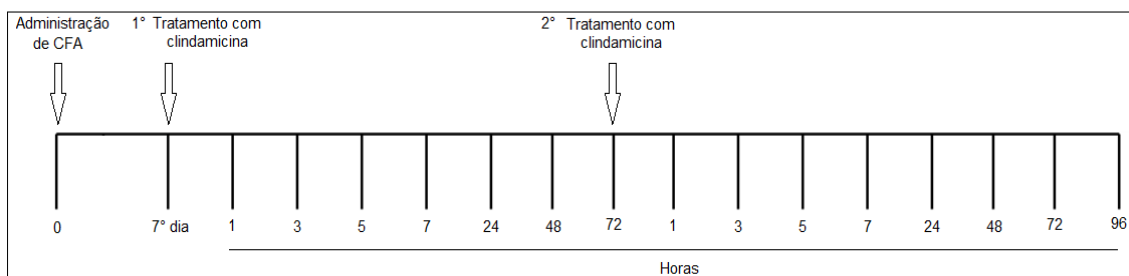
**Figura 9:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA.



**Figura 10:** Escala temporal de avaliação da duração do efeito da clindamicina sobre a alodínia mecânica e edema de pata induzidos por CFA.

#### 4.10 Efeito induzido por administrações repetidas de clindamicina no modelo de dor inflamatória crônica e edema induzido por CFA

Os animais foram tratados com clindamicina (400 mg/kg), pela via i.p., no 7º dia após a injeção de CFA (20 µL). Uma nova administração de clindamicina na mesma dose foi realizada 72 h, após a primeira administração do fármaco. As avaliações de variação de volume da pata e limiar nociceptivo foram feitas nos tempos de 1, 3, 5, 7, 24, 48, 72 e 96 h após a administração de clindamicina. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.



**Figura 11:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido por administrações repetidas de clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA.

#### 4.11 Avaliação da atividade motora

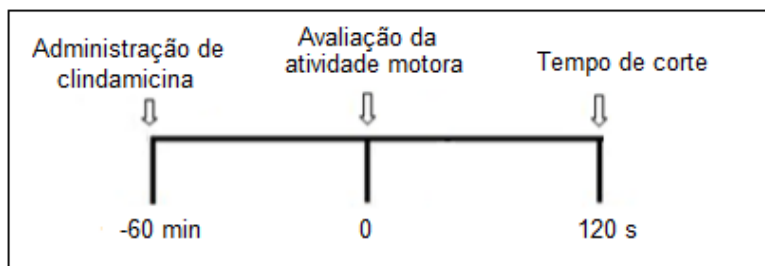
A atividade motora foi avaliada na haste girante (2,3 cm de diâmetro, 14 rpm; Figura 12), de acordo com o procedimento proposto por Vaz et al. (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham & Miya (1957). Nos três dias que antecederam o experimento, cada animal foi ambientado no aparato durante 120 s. No dia do experimento, os animais foram colocados sobre a haste e o tempo basal de permanência foi determinado. O tempo de corte foi de 120 s.

A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os tempos basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais. Os camundongos foram tratados com três diferentes doses de clindamicina (100,

200 e 400 mg/kg), pela via i.p., 1 h antes da avaliação na haste girante. O grupo controle foi tratado com veículo (solução salina estéril, i.p.) e o controle positivo com fenobarbital (50 mg/kg, p.o.), 1 h antes da avaliação.



**Figura 12:** Haste girante utilizada para avaliar a atividade motora.



**Figura 13:** Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela clindamicina ou pelo fenobarbital sobre a atividade motora.

#### 4.12 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor

A avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor foi realizada com auxílio da placa quente (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil – Figura 16). Este modelo foi originalmente descrito por Woolfe & MacDonald (1944). Os animais foram colocados sobre a superfície não aquecida da placa durante 2 min para ambientação no dia anterior ao experimento e no dia da realização do mesmo. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de modo que as massas

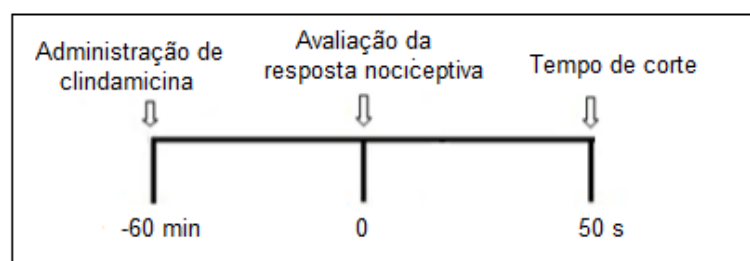
corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes, sendo que para cada grupo experimental foram utilizados seis animais.

Para a realização do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida na temperatura estabelecida e o tempo para que os animais exibissem comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos) foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. A temperatura utilizada foi de 50 °C e o tempo de corte foi de 50 s a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual (Figura 14).

A clindamicina foi administrada pela via i.p., nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, 1 h antes da realização do experimento. Foi administrado o veículo (solução salina estéril, i.p.) e dipirona (500 mg/kg, *p.o.*) como controle do experimento.



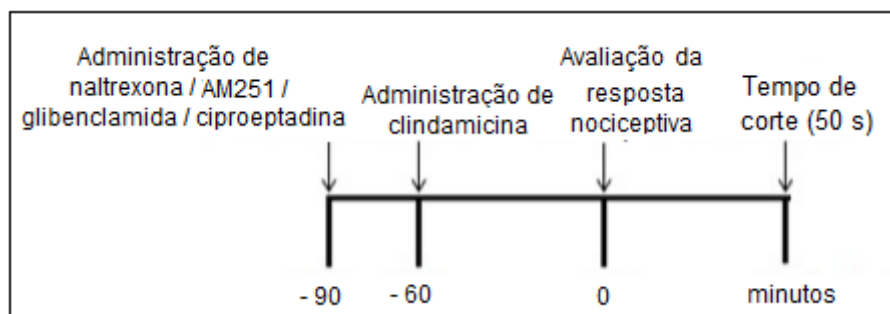
**Figura 14:** Aparato utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.



**Figura 15:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.

#### 4.13 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina, glibenclamida e AM251 sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina

Com o objetivo em avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva da clindamicina no modelo de placa quente, foram utilizados um antagonista opioidérgico (naltrexona 5 e 10 mg/kg), um antagonista serotoninérgico (ciproheptadina 5 e 10 mg/kg), um bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes (glibenclamida 20 e 40 mg/kg) e um antagonista canabinoidérgico (AM251 4 e 8 mg/kg). Naltrexona e AM251 (- 30 min) foram administrados por via i.p., enquanto glibenclamida e ciproheptadina (- 30 min) foram administrados *p.o.* (Figura 16), previamente à administração i.p. de clindamicina (400 mg/kg). Os animais foram avaliados na placa quente 1 h após a administração de clindamicina. O tempo de corte foi de 50 s.



**Figura 16:** Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela clindamicina, após tratamento prévio com naltrexona, AM251, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a nocicepção induzida por calor.

#### 4.14 Quantificação da concentração de TNF- $\alpha$

##### 4.14.1 Coleta e preparo das amostras

Para determinar a concentração de TNF- $\alpha$ , foram coletadas amostras de tecido da pata dos camundongos. As amostras coletadas foram devidamente homogeneizadas (Ultrastirrer, modelo ULTRA 80-11) em solução de extração de citocinas, seguido de centrifugação para utilização do sobrenadante (3000 rpm,

10 min. a 4°C). Para cada 100 mg de tecido foi utilizado 1 mL de solução de extração de citocinas. Para os animais que receberam carragenina (400 µg, 20 µL, i.pl), o tecido foi coletado na 4ª h após a injeção desse estímulo. Para os animais que receberam CFA (1 mg/kg, 20 µL, i.pl.), a coleta foi realizada no 7º dia após a injeção desse estímulo, na 5ª h após o tratamento com clindamicina (400 mg/kg, i.p.).

#### **4.14.2 Determinação da concentração de TNF-α**

Os sobrenadantes resultantes da homogeneização e da centrifugação das amostras foram recolhidos e armazenados a -70 °C. As concentrações de TNF-α foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. O anticorpo de captura foi diluído em PBS e foram adicionados 50 µL dessa solução em cada poço. A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h. Posteriormente, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 1%). Após 1 h, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 50 µL do TNF-α (duplicata), em diluição seriada, correspondentes à curva-padrão, nas duas primeiras colunas da placa. Nos outros poços, foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes diluídos (1:3) em BSA 0,1% e nos últimos dois poços, foram adicionados 50 µL de PBS (branco). A placa foi devidamente vedada e armazenada na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Em seguida, a placa foi lavada e foram adicionados 50 µL do anticorpo de detecção em cada poço e, durante 2 h, a placa foi vedada e mantida em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada e foram adicionados 50 µL do revelador estreptavidina em cada poço e, durante 20 min, a placa foi mantida, novamente, em temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 50 µL da solução do substrato (OPD) em cada poço. A reação foi devidamente monitorada e, com aparecimento de coloração amarelada (5 a 15 min) a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm. Os resultados



foram expressos em quantidade do TNF- $\alpha$  presente no tecido (pg/100 mg de tecido).

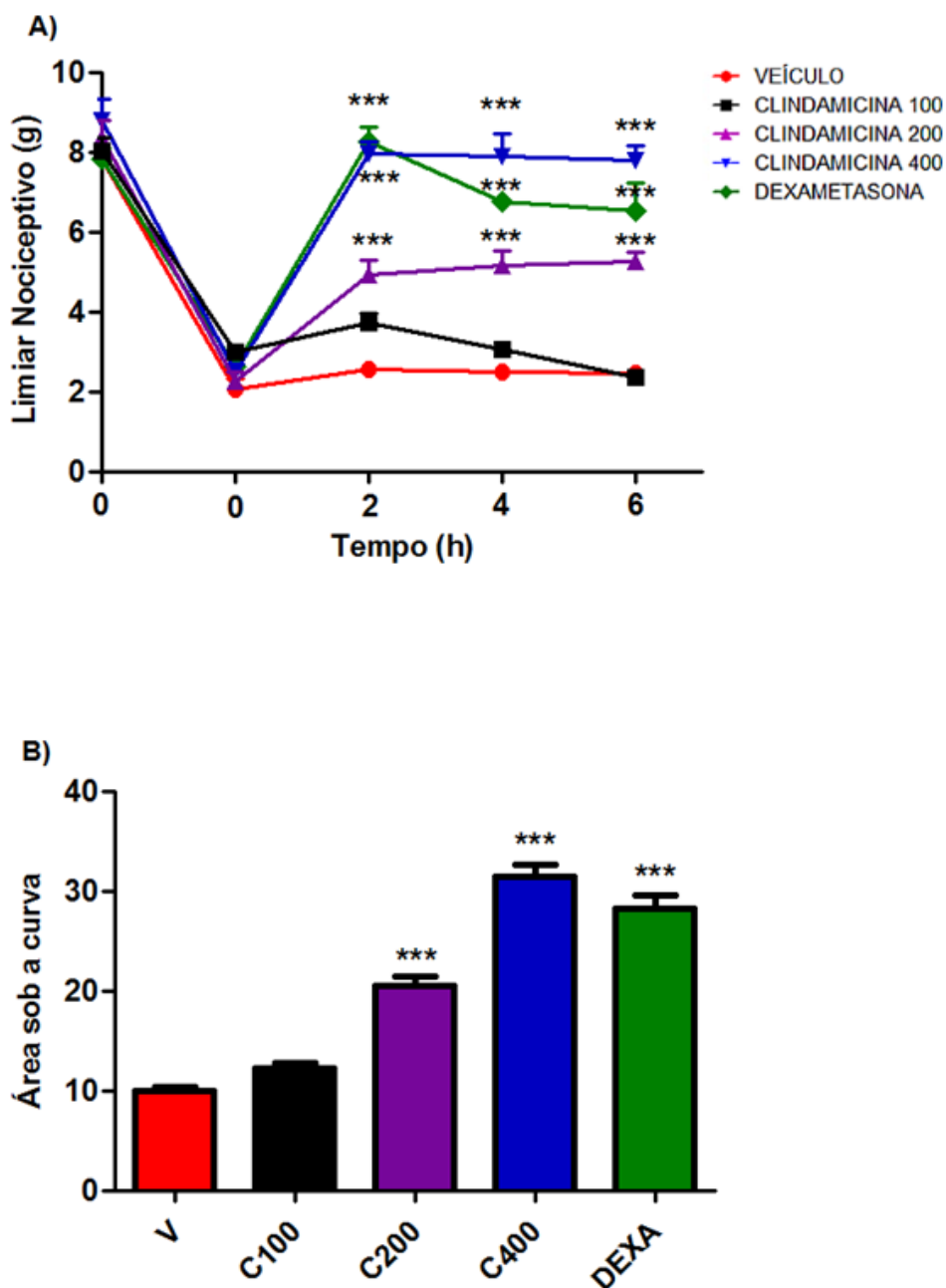
#### **4.15 Análise estatística**

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls ou por meio de análise de variância de duas vias, seguida de teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%.

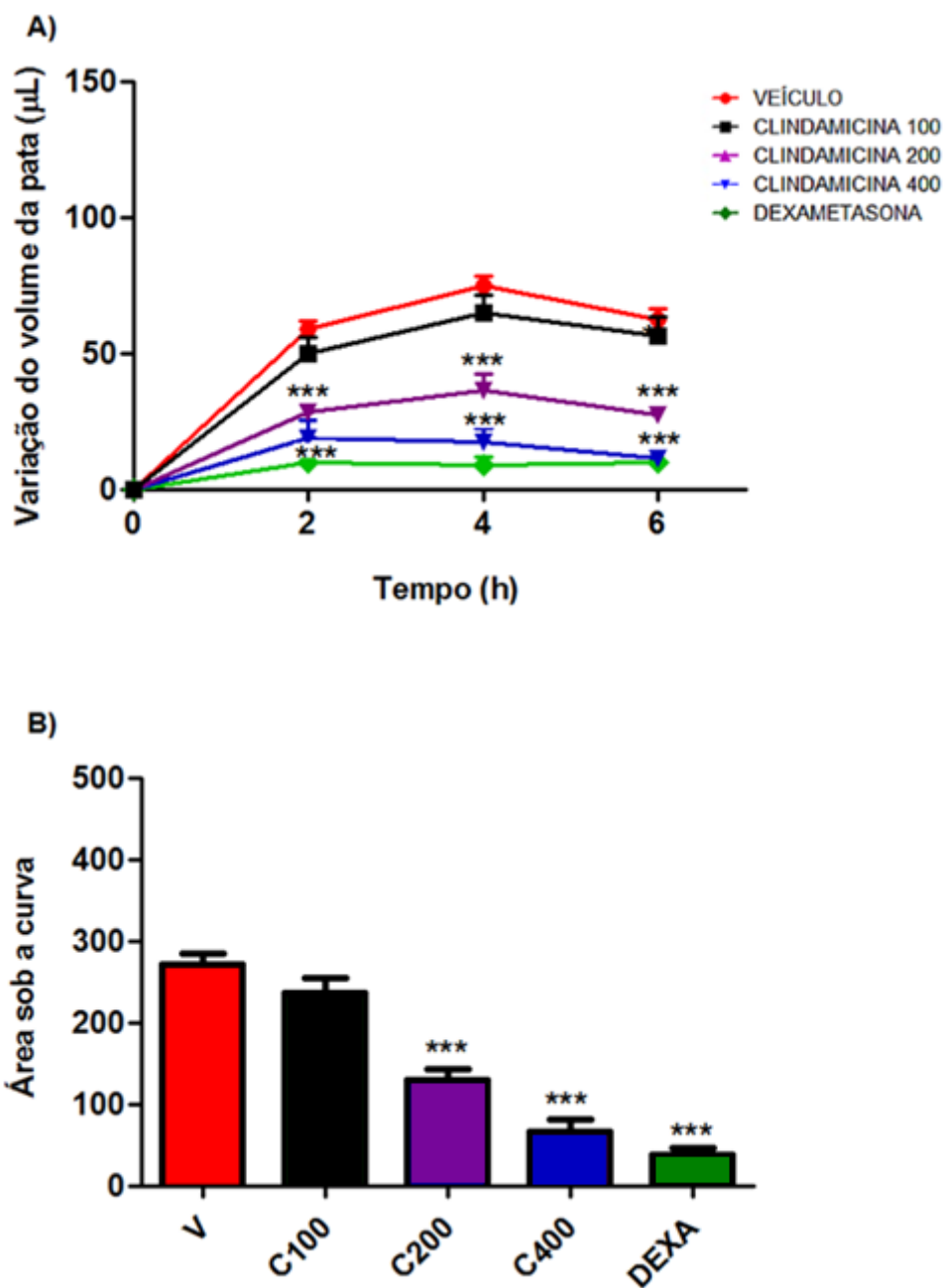
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por carragenina

A atividade da clindamicina nos modelos de alodínia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina foi avaliada. A clindamicina foi administrada 1 h antes da injeção de carragenina. A injeção i.pl. de carragenina induziu alodínia mecânica que se manteve durante todo o período de avaliação (2, 4 e 6 h). O tratamento com dexametasona (10 mg/kg) atenuou a alodínia mecânica induzida por carragenina. As doses de 200 e 400 mg/kg de clindamicina reduziram a alodínia em todos os momentos de avaliação. Já para a dose de 100 mg/kg não observamos alterações significativas da alodínia mecânica quando comparado com o grupo controle (Figura 17). O tratamento com clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu o edema de pata induzido por carragenina. Este efeito não foi observado para a dose de 100 mg/kg de clindamicina. O tratamento com dexametasona reduziu de forma marcante o edema de pata induzido por carragenina (Figura 18).



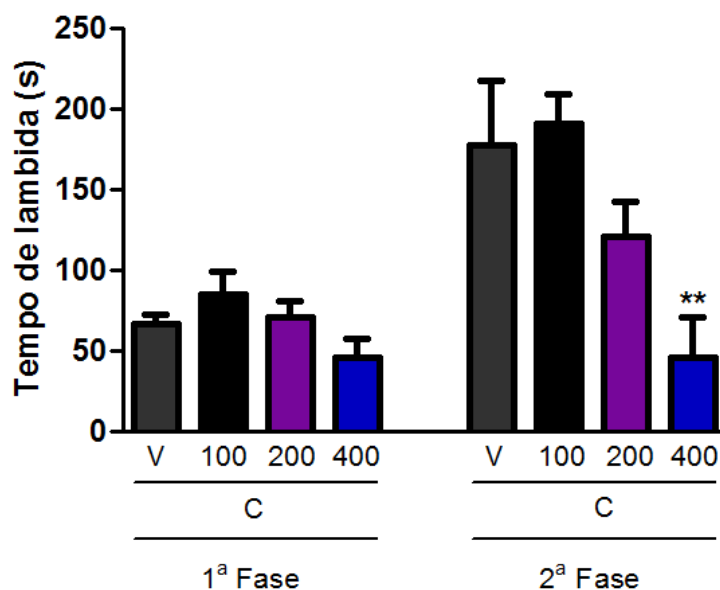
**Figura 17:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., - 1 h), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (400  $\mu$ g, 20  $\mu$ L, i.pl.). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n=6$ .



**Figura 18:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p., -1 h) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por carragenina (400  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{L}$ , i.pl.). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

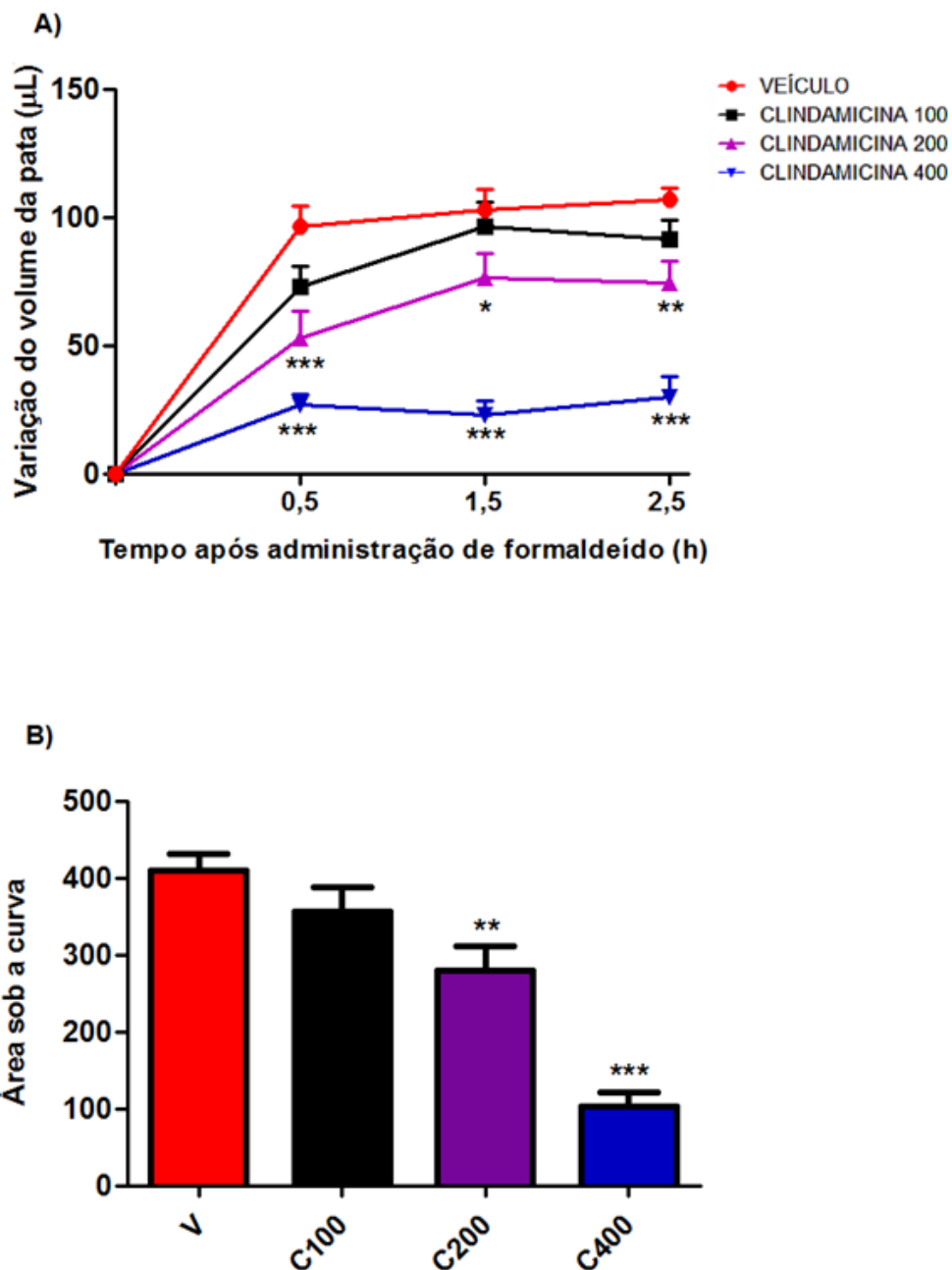
## 5.2 Efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído

A administração intraplantar (i.pl) de formaldeído na pata posterior direita dos camundongos induziu um comportamento nociceptivo caracterizado por lambida, flexão da pata e manutenção desta fora de contato com a superfície. Para a avaliação, foi considerada apenas a duração do comportamento de lambida de pata. As durações médias do comportamento de lambida do grupo controle (veículo), tratado com solução salina 0,9% i.p., foram de, aproximadamente, 66 e 177 s na primeira e na segunda fase, respectivamente. A clindamicina, na dose de 400 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva induzida por formaldeído somente na segunda fase, reduzindo a duração do comportamento de lambida para 47 s (Figura 19).



**Figura 19:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h) ou veículo (V) sobre o comportamento de lambida de pata induzido por formaldeído (0,92%, 20  $\mu$ L, i.pl.). \*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).  $n = 6$ .

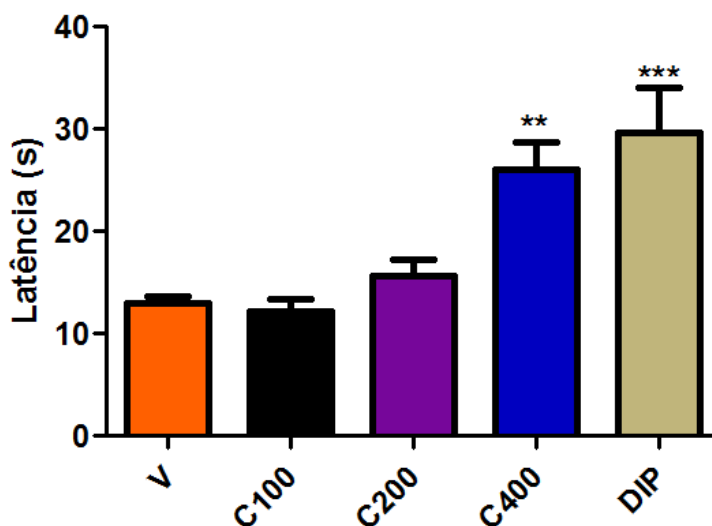
Os efeitos induzidos pela clindamicina sobre o edema de pata induzido por formaldeído foram avaliados imediatamente após a avaliação dos efeitos induzidos por esse fármaco sobre a resposta nociceptiva. A clindamicina reduziu o edema de pata nas doses de 200 e 400 mg/kg durante todo o tempo de avaliação.



**Figura 20:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído (0,92%, 20 µL, i.pl.). \*, \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 6$ .

### 5.3 Efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

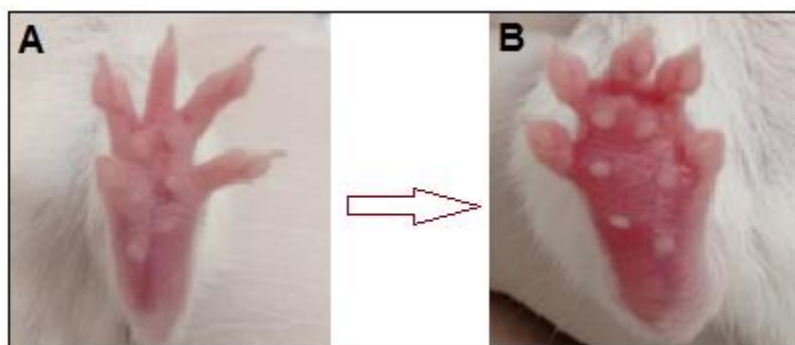
A resposta nociceptiva induzida pelo calor foi avaliada como a latência para os animais apresentarem comportamento indicativo de nocicepção após exposição à placa quente, tais como: lambe as patas anteriores ou posteriores ou saltar. O grupo controle teve uma latência média de aproximadamente 13 s. O grupo tratado com dipirona, controle positivo do experimento, teve uma latência média de 30 s. A clindamicina aumentou a latência para a observação da resposta nociceptiva induzida pelo calor. Somente a dose de 400 mg/kg foi estatisticamente diferente do grupo controle. A latência média do grupo que foi tratado com a maior dose de clindamicina (400 mg/kg), foi de aproximadamente 26 s. As doses de 100 e 200 mg/kg não inibiram a resposta nociceptiva (Figura 21).



**Figura 21:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg; i.p., -1 h), dipirona (DIP; 500 mg/kg, p.o., -1 h) ou veículo sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50° C). \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 6$ .

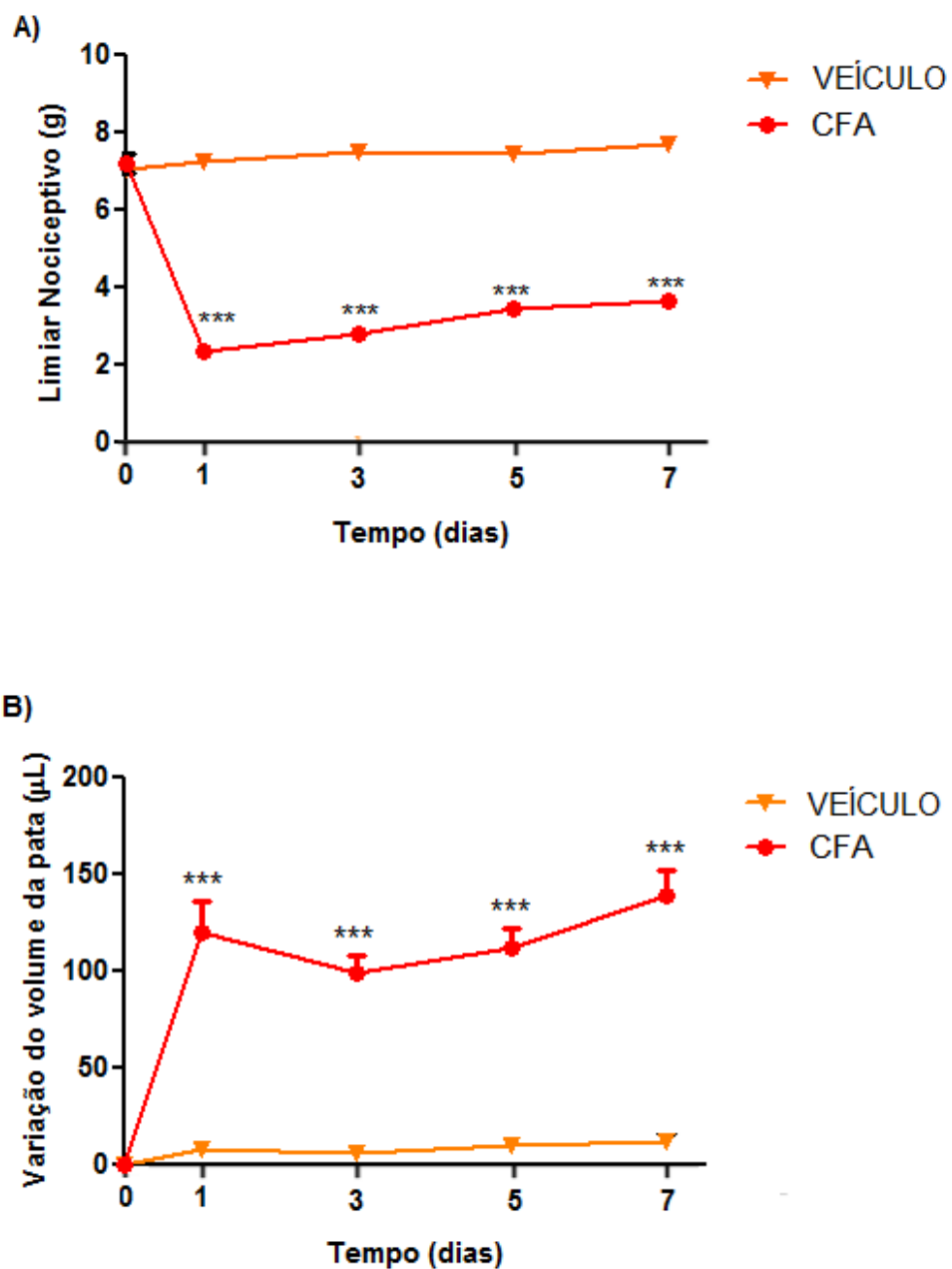
#### 5.4 Padronização do modelo de dor inflamatória crônica induzida por CFA

A injeção i.pl. de CFA reduziu o limiar nociceptivo (Figura 23A), caracterizando a alodínia mecânica, e induziu edema de pata (Figura 23B). Estas respostas se mantiveram durante todo o período avaliado (7 dias). O grupo controle, o qual recebeu apenas injeção i.pl. de solução salina estéril, não apresentou alterações significativas. Ao longo do período de avaliação, os animais que receberam o estímulo inflamatório desenvolveram edema e eritema no local de aplicação (Figura 22).



**Figura 22:** Pata normal (A) e pata com edema (B) no 7º dia após injeção de CFA.





**Figura 23:** Limiar nociceptivo (A) e volume da pata (B) após a administração i.pl. de salina estéril (veículo) ou CFA (1 mg/mL, 20 µL). \*\*\* indica diferença estatística significativa em relação ao grupo veículo ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

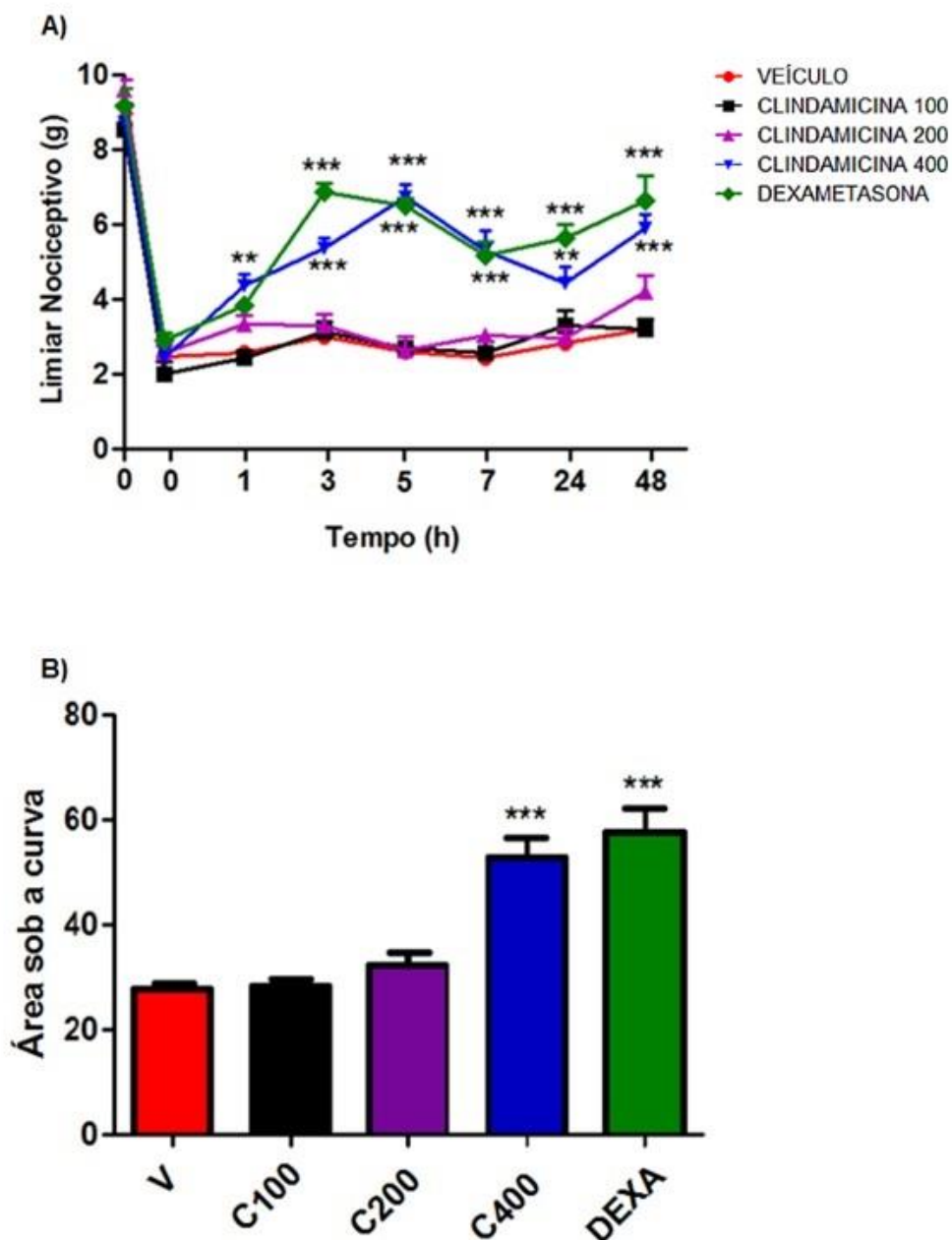
### **5.5 Efeito induzido pela clindamicina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA**

A atividade da clindamicina nos modelos de alodínia mecânica e edema de pata induzidos por CFA foi avaliada por meio de dois protocolos.

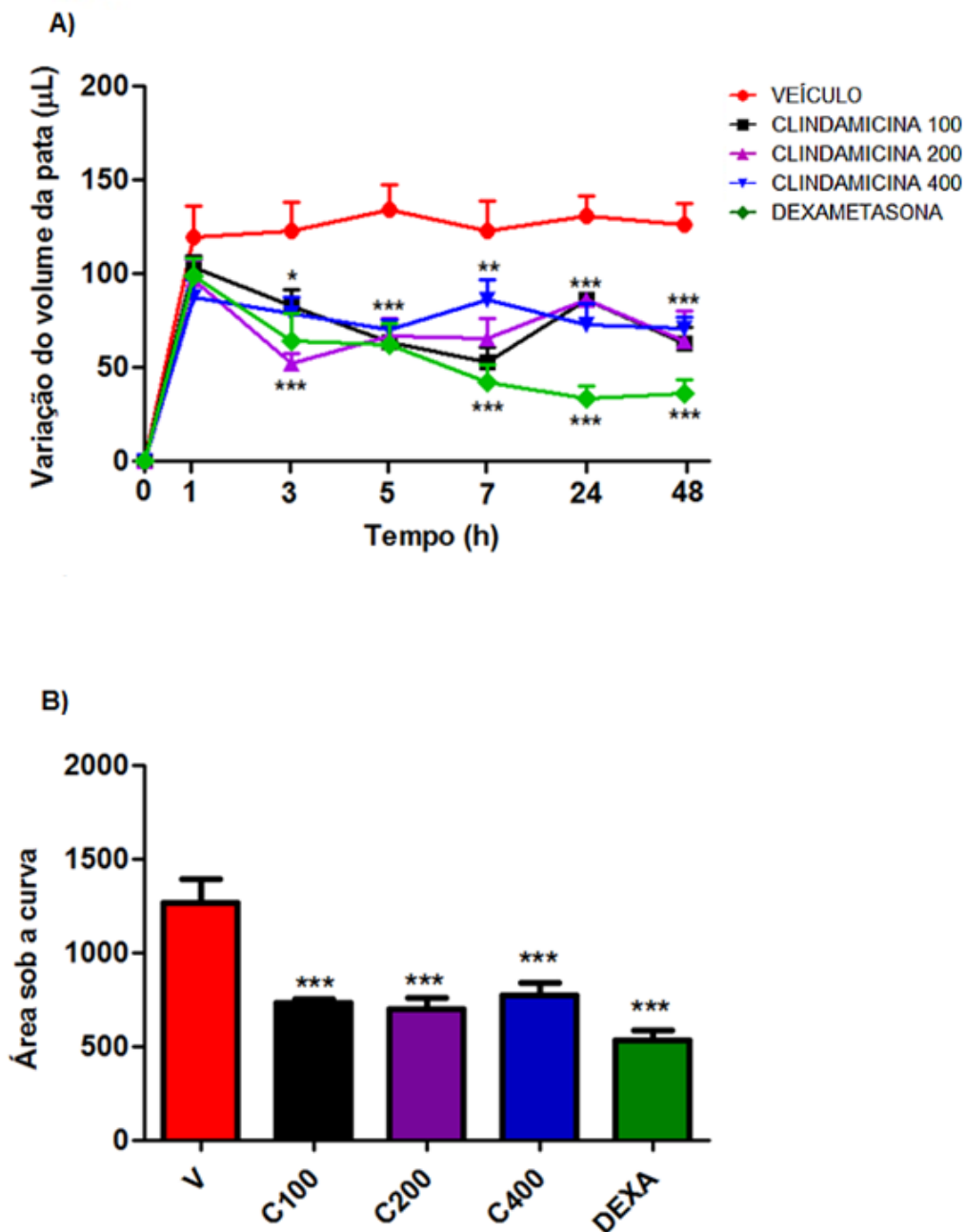
No primeiro, foi feita a administração de clindamicina um dia após a injeção de CFA. O grupo controle apresentou alodínia após a injeção do estímulo que se manteve durante todo o período experimental. Neste protocolo, a clindamicina, na dose de 400 mg/kg, mas não nas doses de 100 e 200 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica induzida por CFA. O grupo de animais tratado com dexametasona foi utilizado como controle positivo do experimento. O tratamento com dexametasona atenuou a alodínia mecânica induzida pelo CFA (Figura 24).

A injeção i.pl. de CFA também induziu edema de pata. A clindamicina, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, reduziu o edema de pata induzido por CFA. Essa resposta também foi inibida pelo tratamento prévio dos animais com dexametasona (Figura 25).

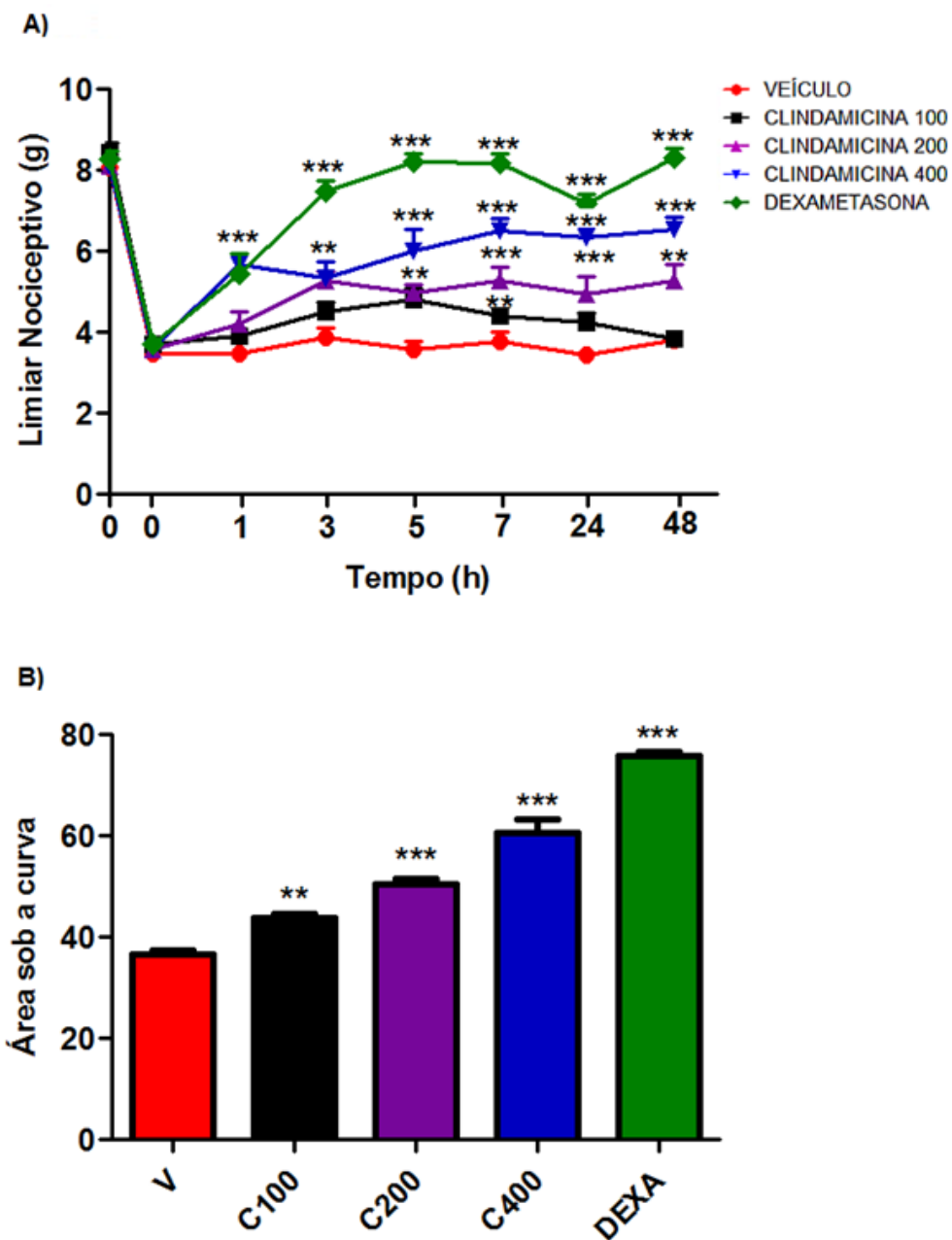
No segundo protocolo, a clindamicina foi administrada no 7º dia após a injeção de CFA. Nesse protocolo, a média dos valores basais da alodínia mecânica foi de aproximadamente 8 g para todos os grupos experimentais. No grupo controle, os valores observados após a injeção de CFA foram de 3,5; 3,9; 3,6; 3,8; 3,4 e 3,9; respectivamente. A administração de clindamicina atenuou, de maneira dose dependente, a alodínia mecânica induzida pelo CFA, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. O tratamento com dexametasona também atenuou a alodínia mecânica induzida por CFA (Figura 26). Foi observado que no 7º dia após a injeção de CFA, os animais apresentaram acentuado edema na pata com valores médios de variação do volume da pata de 145, 138, 148, 145, 143 e 135 após a administração de CFA. O tratamento com clindamicina também atenuou o edema de pata induzido por CFA (Figura 27).



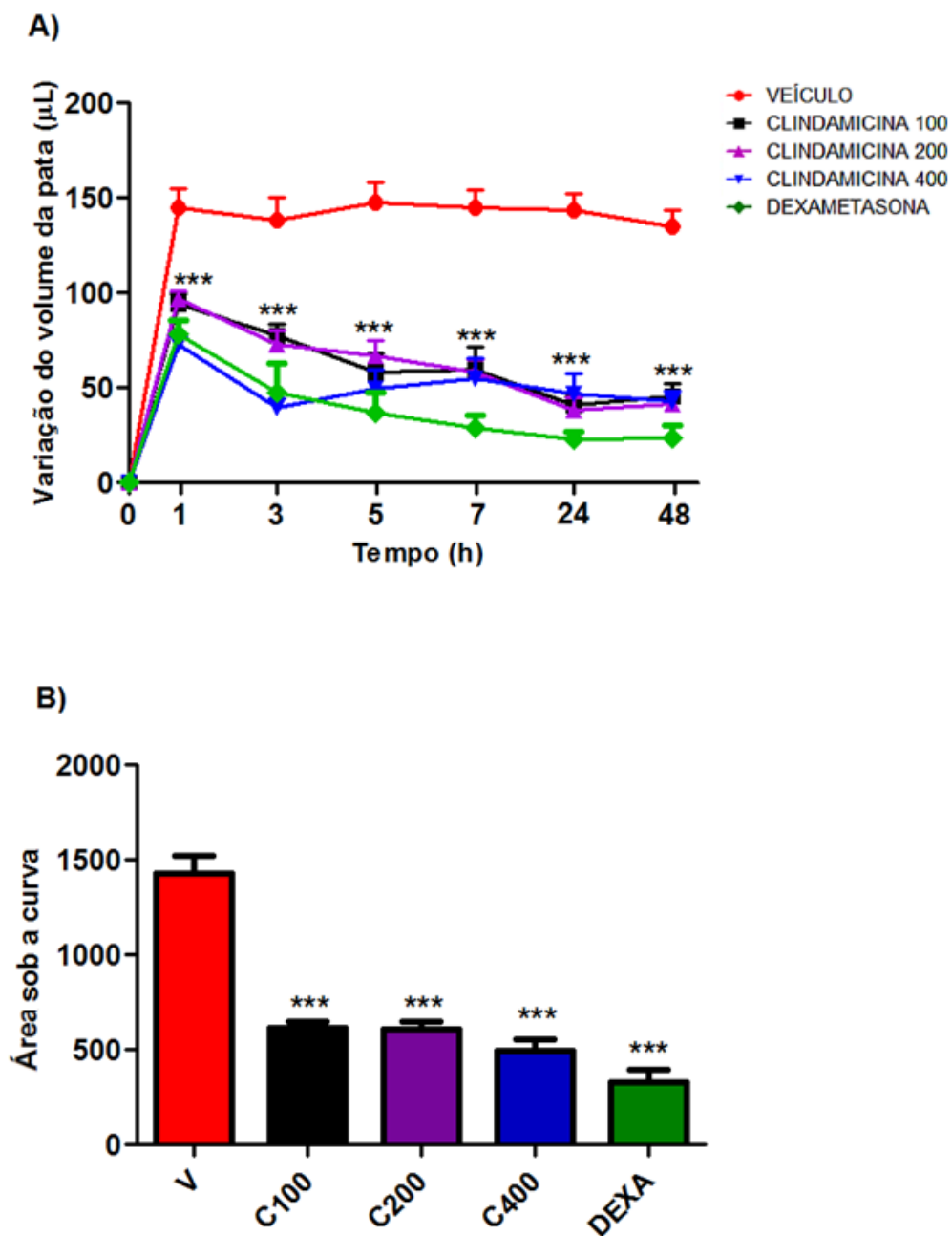
**Figura 24:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 1º dia após indução), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por CFA (20 µL). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle negativo ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .



**Figura 25:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 1º dia após indução), dexametasona (DEXA; 10 mg/kg, i. p.) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por CFA (20 µL). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .



**Figura 26:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 7º dia após a indução), dexametasona (DEXA, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica induzida por CFA (20 µL). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 6$ .



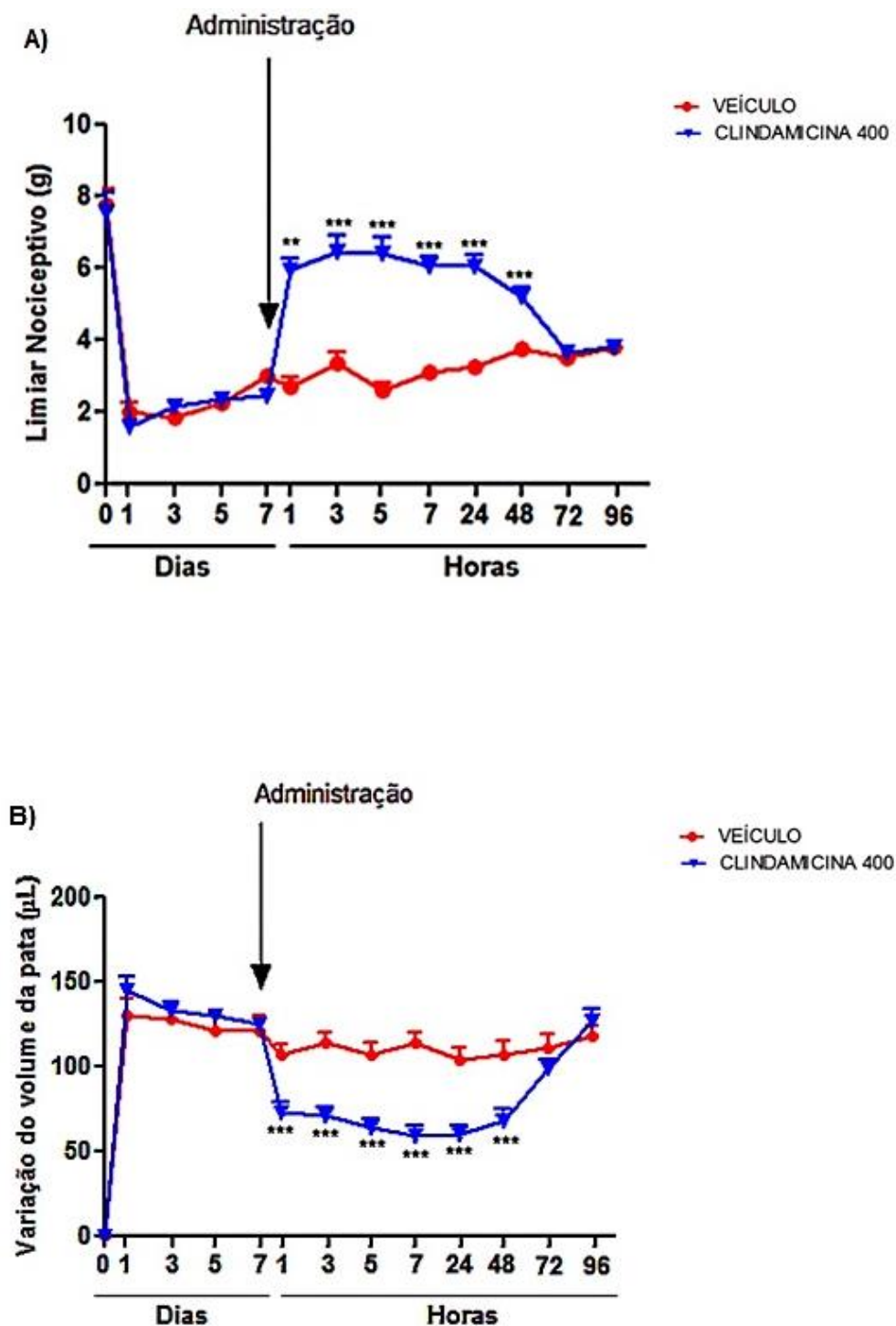
**Figura 27:** Efeito induzido por clindamicina (C; 100, 200 e 400 mg/kg, i.p., 7° dia após a indução), dexametasona (DEXA, 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre o edema de pata induzido por CFA (20 µL). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

### **5.6 Avaliação da duração dos efeitos antialodínico e antiedematogênico induzidos pela clindamicina no modelo de dor inflamatória crônica induzida por CFA**

Conforme demonstrado nas figuras 26 e 27, os animais que foram tratados com as três diferentes doses de clindamicina no 7º dia após a injeção de CFA, apresentaram efeitos antialodínico do tipo dose-dependente. O efeito induzido pela clindamicina em tais protocolos foi duradouro, permanecendo por até 48 h. Desta forma, na tentativa de avaliar a duração desse efeito, os camundongos foram tratados com 400 mg/kg de clindamicina, pela via i.p. e os efeitos antialodínico e antiedematogênico foram avaliados por até 96 h. Conforme observado na figura 28, as atividades antialodínica e antiedematogênica da clindamicina se mantiveram por 48 h após a administração do fármaco. Desse modo, não foi observado efeito após 72 h e 96 h da administração.

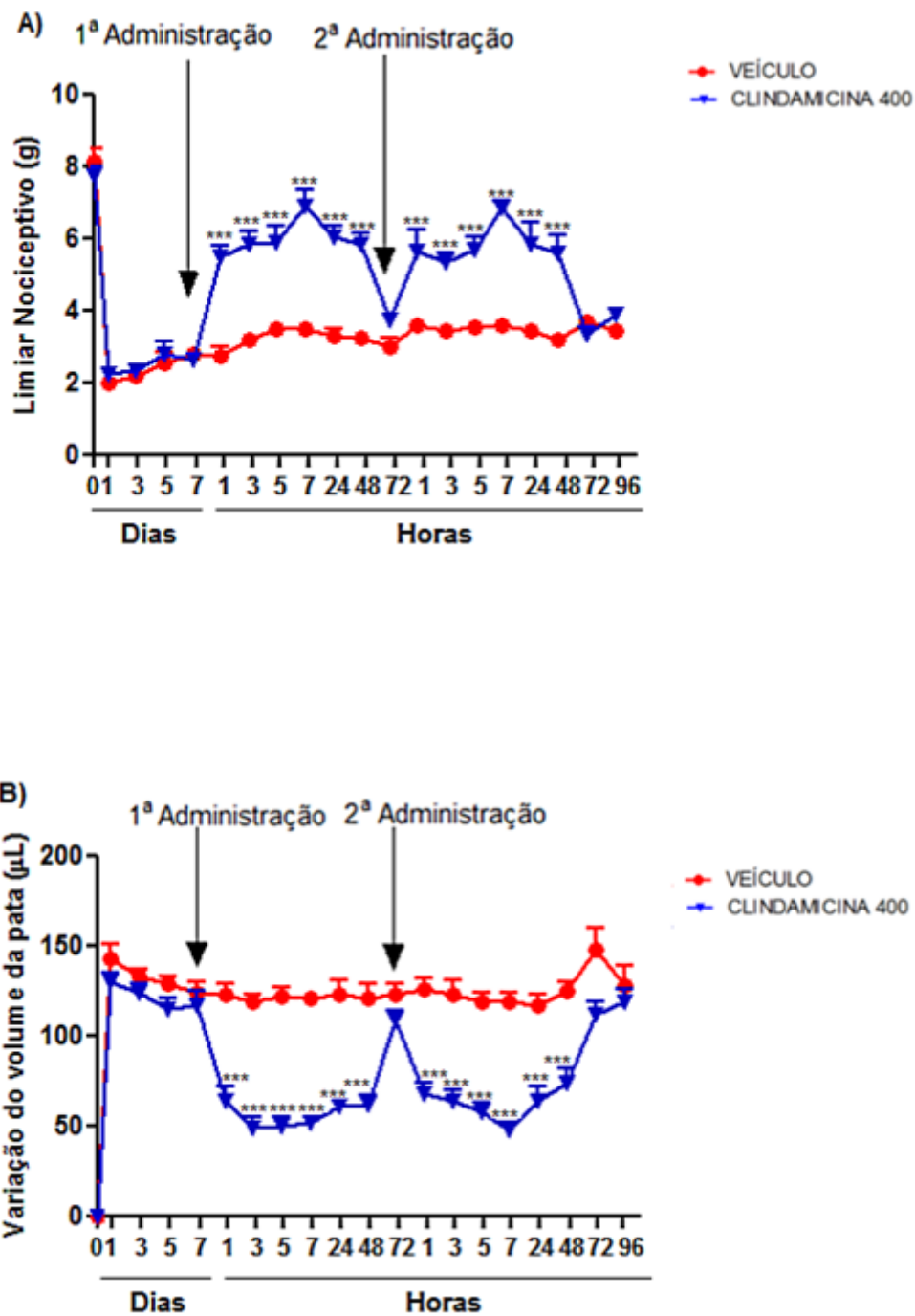
### **5.7 Avaliação dos efeitos antialodínico e antiedematogênico induzidos por administrações repetidas de clindamicina no modelo de dor inflamatória crônica induzida por CFA**

Conforme observado anteriormente, a administração de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) atenuou a alodínia mecânica e reduziu o edema de pata, induzidos pelo CFA. A clindamicina, administrada a partir do 7º dia após a injeção de CFA, alterou a alodínia mecânica e o edema de pata por até 48 h. Sendo assim, foi realizada uma nova administração de clindamicina, após 72 h da primeira administração do fármaco, uma vez que, conforme demonstrado, não foi observado efeito farmacológico neste tempo. Assim, foi verificado que a segunda administração de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) induziu alterações semelhantes às observadas após a primeira administração, novamente com duração do efeito por até 48 h em relação à alodínia mecânica e ao edema de pata (Figura 29).



**Figura 28:** Avaliação da duração do efeito induzido pela clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica (A) e o edema de pata (B), induzidos por CFA (20µL). \*\* e \*\*\* indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .

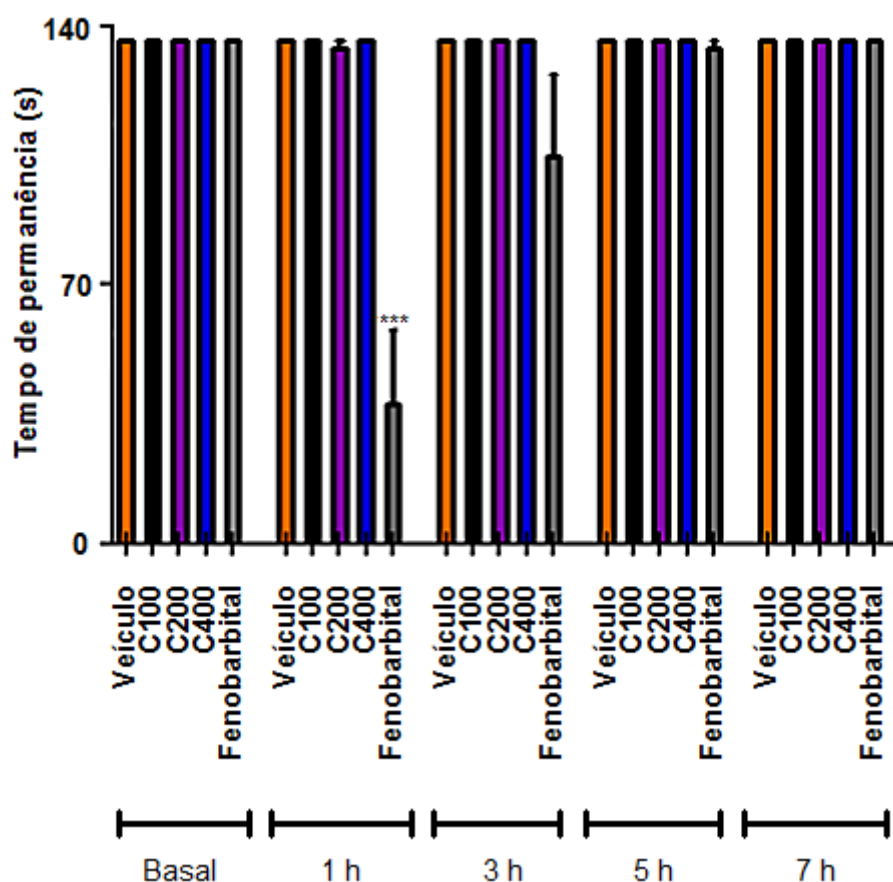




**Figura 29:** Efeitos induzidos por administrações repetidas de clindamicina (400 mg/kg, i.p.) ou veículo (V) sobre a alodínia mecânica (A) e o edema de pata (B) induzido por CFA (20 μL), quando tratados no 7º e 10º dia após indução. \*\*\* indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

### 5.8 Efeito induzido pela clindamicina sobre a atividade motora

A atividade motora dos camundongos foi avaliada na haste girante com o objetivo de validar os resultados obtidos nos modelos experimentais de dor. A clindamicina, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg ou o veículo (grupo controle) não alteraram o tempo de permanência dos animais na haste girante, durante as 7 h de avaliação. Entretanto, o fenobarbital (50 mg/kg) reduziu significativamente esse tempo para aproximadamente 24 s, na 1ª h de avaliação. No decorrer da avaliação, o tempo de permanência dos animais que foram tratados com fenobarbital, foi aumentado (Figura 30).

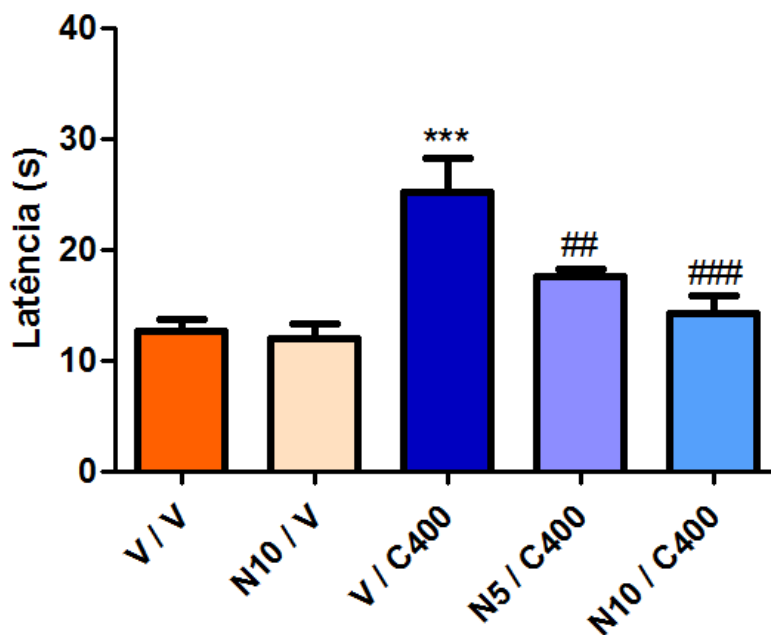


**Figura 30** : Efeito induzido por clindamicina (C;100, 200 e 400 mg/kg, i.p., -1 h), fenobarbital (50 mg/kg, p.o., -1 h) ou veículo (V) sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n=6$ .

### **5.9 Efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina, glibenclamida e AM251 sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina**

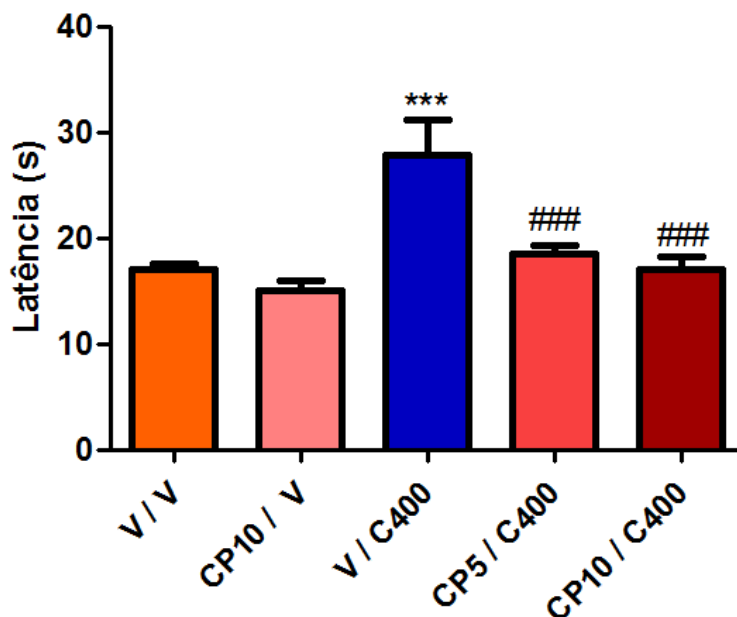
No item 5.3 foi demonstrado o efeito induzido pela clindamicina sobre a resposta nociceptiva induzida pelo calor. Constatou-se que somente a dose de 400 mg/kg apresentava atividade antinociceptiva. Desta forma, nos experimentos subsequentes, utilizando o modelo de resposta nociceptiva induzida pelo calor, optou-se por utilizar a dose de 400 mg/kg de clindamicina. Na tentativa de investigar os mecanismos que estariam envolvidos na atividade antinociceptiva da clindamicina, avaliaram-se os efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina, glibenclamida e AM251 sobre essa atividade.

No primeiro protocolo, os animais tratados com clindamicina (400 mg/kg) apresentaram um tempo de latência médio de 25 s, sendo este valor estatisticamente diferente dos que receberam apenas veículo, os quais tiveram um tempo de latência médio de 13 s. A naltrexona nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziu significativamente a atividade antinociceptiva da clindamicina (Figura 31). A naltrexona, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg não alterou a latência.



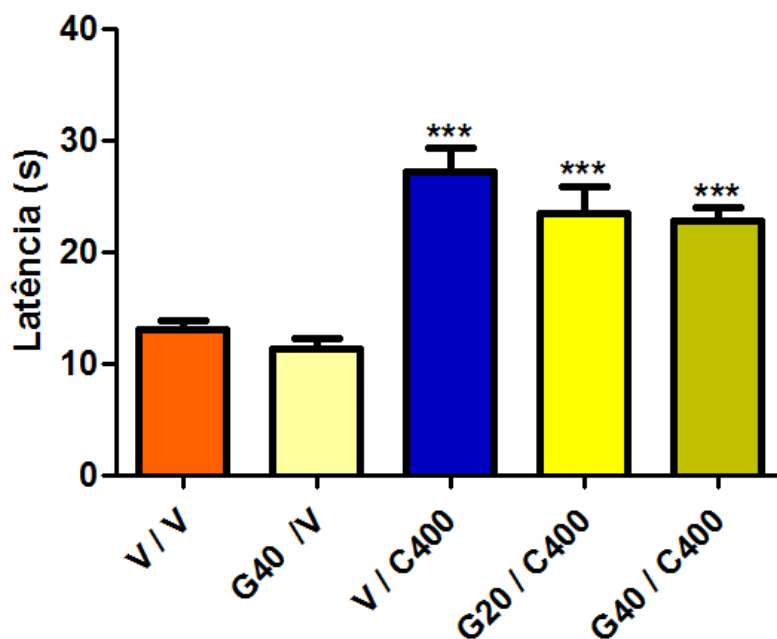
**Figura 31:** Efeito induzido pela naltrexona (N; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p.) no modelo de placa quente. A naltrexona foi administrada 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação do limiar nociceptivo. Veículo (V). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ## e ### indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com clindamicina ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$

No segundo protocolo, os animais que foram tratados com clindamicina apresentaram um tempo de latência média na placa de aproximadamente 28 s, enquanto que os animais que foram tratados com veículo apresentaram uma média de 17 s. A ciproheptadina, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não alterou a latência, a qual foi de aproximadamente 15 s. A ciproheptadina nas doses de 5 e 10 mg/kg reverteu a atividade antinociceptiva da clindamicina, a qual diferiu estatisticamente do grupo tratado com clindamicina (19 e 17 s, respectivamente) (Figura 32).



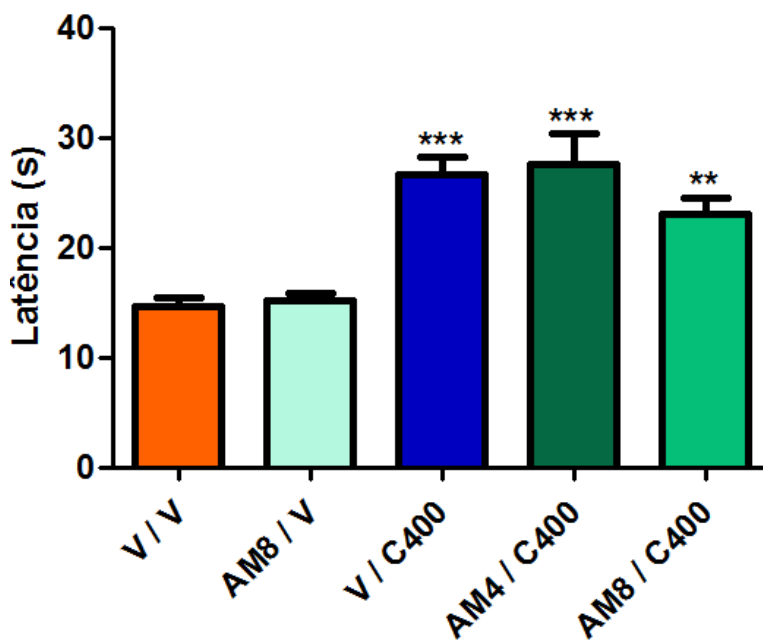
**Figura 32:** Efeito induzido pela ciproheptadina (CP; 5 ou 10 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (400 mg/kg, *i.p.*) em modelo de placa quente. A ciproheptadina foi administrada 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação na placa quente. Veículo (V). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle  $p < 0,001$ . ### indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com clindamicina ( $p < 0,001$ ).  $n=6$

No terceiro protocolo, a latência do grupo controle foi de, aproximadamente, 13 s. A clindamicina, na dose de 400 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva, aumentando a latência para, aproximadamente, 27 s. A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não alterou a latência. A latência média desse grupo foi de, aproximadamente, 11 segundos, não diferindo estatisticamente do grupo controle (veículo). O tratamento prévio com glibenclamida, nas doses de 20 mg/kg ou 40 mg/kg, não alterou a atividade antinociceptiva da clindamicina (Figura 33).



**Figura 33:** Efeito induzido pela glibenclamida (G; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, *i.p.*) em modelo de placa quente. A glibenclamida foi administrada 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação na placa quente. Veículo (V). \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).  $n=6$ .

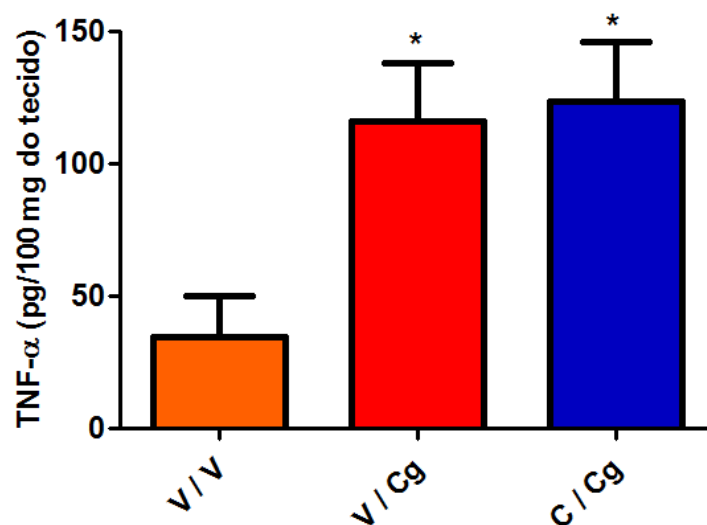
No quarto protocolo, a latência do grupo controle foi de, aproximadamente, 15 s. A clindamicina, na dose de 400 mg/kg, inibiu a resposta nociceptiva, aumentando a latência para, aproximadamente, 27 s. O AM251, administrado isoladamente na dose de 8 mg/kg, não alterou a latência, sendo, esta, de aproximadamente 15 s. O tratamento prévio com AM251, nas doses de 4 mg/kg ou 8 mg/kg, não alterou a atividade antinociceptiva da clindamicina (Figura 34).



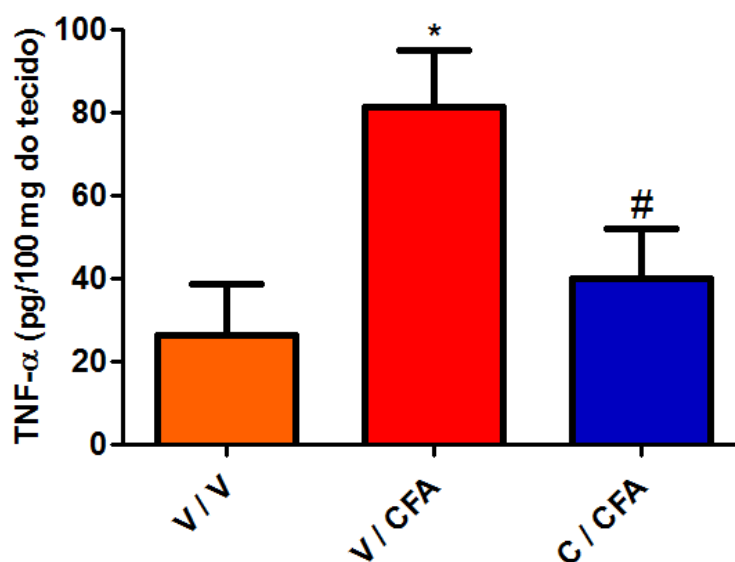
**Figura 34** : Efeito induzido pelo AM251 (AM; 4 ou 8 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da clindamicina (C; 400 mg/kg, i.p.) em modelo de placa quente. O AM251 foi administrado 30 min antes da clindamicina e esta foi administrada 60 min antes da avaliação na placa quente. Veículo (V). \*\* e \*\*\* indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=6$ .

### 5.10 Efeito induzido pela clindamicina sobre a produção de TNF- $\alpha$ induzida por carragenina ou CFA

As concentrações de TNF- $\alpha$  na pata dos animais apresentaram-se aumentadas 4 h após a injeção i.pl. de carragenina (Figura 35) ou 7 dias após a injeção i.pl. de CFA (Figura 36). Conforme demonstrado na Figura 35, foi observado que a administração de clindamicina (400 mg/kg, i.p.), 1 h antes da injeção de carragenina, não alterou a concentração de TNF- $\alpha$  no tecido da pata. Por outro lado, foi observado que a administração de clindamicina, na mesma dose e via, reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  na 5ª h do 7º dia após a injeção de CFA (Figura 36).



**Figura 35:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400 mg/kg, i. p., -1 h) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  na pata de animais coletada 4 h após a injeção de carragenina (Cg, 400  $\mu$ g, 20  $\mu$ L, i.pl.). Veículo (V). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). n=6.



**Figura 36:** Efeito induzido pela clindamicina (C; 400mg/kg, i.p., -1 h) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  na pata de animais coletada na 5ª h após o tratamento com clindamicina no 7º dia após a injeção de CFA (1 mg/kg, 20  $\mu$ L, i.pl.). Veículo (V) \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo/CFA ( $p < 0,05$ ). n=6.



## 6 DISCUSSÃO

Os fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas ainda apresentam limitações como eficácia reduzida ou segurança inadequada, principalmente durante o tratamento de pacientes com doenças crônicas. Assim, a busca de novas terapias para pacientes acometidos por inflamações ou dores crônicas é um desafio para a farmacoterapia. Pesquisas visando ao reposicionamento de fármacos têm sido cada vez mais estimuladas e têm ocorrido tanto nas indústrias farmacêuticas quanto na academia (BASTOS & COELHO, 2014; CHONG & SULLIVAN, 2007).

A clindamicina é um antibiótico que pertence ao grupo das lincosamidas, sendo frequentemente utilizada no tratamento de pacientes com infecções e reduz a produção de citocinas inflamatórias em alguns ensaios *in vitro*. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade deste fármaco em modelos experimentais de dor e inflamação ou, ainda, sobre os mecanismos de ação envolvidos nas atividades desse fármaco.

Neste estudo, foram avaliadas as atividades da clindamicina em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação em camundongos. Demonstramos que a clindamicina apresentou atividade em modelos agudos e crônicos de dor e inflamação, apresentando ações tanto na nocicepção quanto na inflamação. Os mecanismos parecem envolver a participação de receptores opioidérgicos e serotoninérgicos e também a redução da produção de TNF- $\alpha$ .

Inicialmente, investigamos a atividade da clindamicina em modelos experimentais de dor e inflamação agudas em camundongos. Primeiramente, a atividade da clindamicina foi avaliada no modelo de edema de pata induzido por carragenina. O edema de pata induzido pela injeção i.pl. de carragenina é um modelo amplamente utilizado para a investigação de candidatos a fármacos anti-inflamatórios e analgésicos. A carragenina, uma mistura de polissacarídeos composta por D-galactose sulfatada, quando injetada localmente, induz resposta inflamatória, caracterizada por edema e alodínia mecânica, entre outras alterações (POSADAS et al., 2004; WINTER et al., 1962). A resposta inflamatória

induzida pela carragenina é resultado da ação de diversos mediadores inflamatórios, principalmente, histamina, serotonina, prostanoídes, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SALVEMINI et al., 1996; IANARO et al., 1994; FERREIRA et al., 1993; CRUNKHORN & MEACOCK, 1971). Esses mediadores, além de desencadearem um processo inflamatório agudo, aumentando a permeabilidade vascular e extravasamento de líquido e proteínas, induzem hiperalgesia por sensibilizar os nociceptores periféricos (MONTES et al., 2016, ZHANG et al., 2004).

O pré-tratamento dos animais com clindamicina, nas doses de 200 e 400 mg/kg reduziu o edema de pata e a alodínia mecânica induzidos por carragenina. Neste modelo, a eficácia da clindamicina foi semelhante à da dexametasona. A redução do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos por carragenina em animais tratados com clindamicina pode estar relacionada ao efeito inibitório induzido por este fármaco sobre a produção de vários mediadores inflamatórios. O acúmulo de leucócitos polimorfonucleares também contribui de forma marcante para a resposta nociceptiva em diferentes modelos experimentais de dor, provavelmente devido a conhecida capacidade dessas células, uma vez ativadas, de secretarem diversos mediadores inflamatórios (RITTNER et al., 2005). Assim, investigamos no presente estudo, os mecanismos que medeiam as atividades antiedematogênica e antialodínica da clindamicina. Estudos têm demonstrado que o TNF- $\alpha$  apresenta um papel relevante no desenvolvimento do edema inflamatório, uma vez que, o edema induzido por carragenina foi reduzido em animais deficientes para o receptor de TNF- $\alpha$  ou tratados com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  (ROCHA et al., 2006). Outro estudo demonstrou a importância do TNF- $\alpha$  na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina (CUNHA et al., 2005).

Como a produção TNF- $\alpha$  é estimulada pela injeção de carragenina e contribui para o desenvolvimento de edema de pata, alodínia e nocicepção (VALÉRIO et al., 2007; ROCHA et al., 2006; CUNHA et al., 2005), investigamos se a atividade da clindamicina estava associada à redução da produção de TNF- $\alpha$  na pata dos animais. Verificamos, entretanto, que a administração de clindamicina, na dose de 400 mg/kg, não reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  na pata dos animais.

Embora a clindamicina seja eficaz na redução do edema de pata e alodínia mecânica, esta ação parece não estar relacionada com a redução da produção de TNF- $\alpha$ . Podemos inferir que a ação da clindamicina nesse modelo experimental esteja relacionada ao efeito inibitório sobre a produção de outros mediadores inflamatórios. Estudos têm demonstrando que a clindamicina inibe a produção de outros mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$  e prostaglandinas, em diferentes modelos experimentais (SATO et al., 2012; HIRATA et al., 2001).

É importante salientar que as doses de clindamicina usadas no presente estudo foram escolhidas a partir do estudo de Hirata e colaboradores (2001). Neste estudo, utilizando o modelo experimental de choque endotóxico, os camundongos tratados pela via i.p. com clindamicina, nas doses de 160, 300 e 440 mg/kg, apresentaram aumento da sobrevivência. Entretanto, aqueles que receberam doses entre 520 a 600 mg/kg apresentaram maior mortalidade. Assim, estabelecemos as doses de clindamicina de 100, 200 e 400 mg/kg para o desenvolvimento deste estudo.

Em seguida, avaliamos a atividade da clindamicina em modelo experimental de dor que agrega aspectos tanto da dor nociceptiva quanto da dor inflamatória. A resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos é composta por duas fases. A primeira fase, que apresenta características de um modelo de dor nociceptiva, ocorre entre 0 e 5 min após a administração do estímulo e envolve a ativação direta de nociceptores, principalmente fibras C. A segunda fase, que apresenta características de um modelo de dor inflamatória, ocorre entre 15 e 30 min após a administração do formaldeído e está associada à produção de vários mediadores inflamatórios (YAMATO et al., 2013; TJØLSEN *et al.*, 1992). Fármacos analgésicos com ação predominantemente central, como os opioides, bem como alguns AINEs em doses mais elevadas, como o ácido acetilsalicílico, têm ação sobre ambas as fases, enquanto fármacos com ação predominantemente anti-inflamatória, como a maioria dos AINEs, geralmente inibem apenas a segunda fase (TJØLSEN *et al.*, 1992; HUNSKAAR & HOLE, 1987).

A clindamicina, na dose de 400 mg/kg, atenuou a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Adicionalmente, a clindamicina,

nas doses de 200 e 400 mg/kg, reduziu o edema de pata induzido por formaldeído. Esse resultado indica que a atividade da clindamicina pode estar associada à inibição da produção e/ou ação de mediadores inflamatórios que têm importância nesse processo. Esses resultados relacionam-se àquele observado no modelo de inflamação induzido por carragenina, no qual a clindamicina também apresentou atividade. Assim, é bastante provável que a inibição desses fenômenos contribua para explicar a atividade antiedematogênica do fármaco no modelo de edema induzido por formaldeído, que envolve mediadores semelhantes. Também há evidências em estudo clínico indicando que a clindamicina apresenta atividade analgésica em condições inflamatórias. Estudo realizado em humanos revelou que pacientes com abscessos odontogênicos, apresentando infiltrado inflamatório gengival, e que foram tratados diariamente com clindamicina (300 mg) por 5 dias, apresentaram alívio da dor (CACHOVAN et al., 2011).

Tendo em vista os resultados anteriores indicando a atividade antinociceptiva da clindamicina em modelo de dor inflamatória, investigamos a atividade desse fármaco em modelo experimental de dor provocada por estímulo térmico. No modelo de placa quente (50°C), o estímulo térmico leva a um comportamento nociceptivo nos animais pela ativação direta dos nociceptores (Le BARS et al., 2001). Neste modelo, ocorre a ativação de receptores da família TRP (receptor de potencial transitório) pelo estímulo nocivo (calor) (TOMINAGA et al., 1998). Opioides e antidepressivos tricíclicos são capazes de aumentar a latência para o comportamento nociceptivo mencionado (ROSLAND et al., 1988; MESDJIAN et al., 1983; LOH et al., 1976).

A clindamicina elevou de forma significativa a latência para o comportamento nociceptivo no modelo de placa quente, sendo esta resposta semelhante àquela da dipirona, utilizada como controle positivo neste modelo. A atividade apresentada pela clindamicina nesse modelo experimental sugere ações no processamento nociceptivo no SNC ou nos mecanismos de ativação direta de nociceptores. Existem, ainda, relatos na literatura de que a clindamicina é capaz de interferir em mecanismos pré e pós-sinápticos da neurotransmissão,

além de induzir abertura de canais iônicos em neurônios (LEE et al., 2008; AL AHDAL & BEVAN, 1995; KONOPKA & PARSONS, 1988).

Investigamos em seguida, a atividade da clindamicina em modelo de inflamação crônica - edema de pata e alodínia mecânica induzidos pelo CFA. A injeção de CFA na pata posterior de roedores induz um processo inflamatório duradouro, levando a alodínias mecânica e térmica, que podem se estender por semanas (SANDKUHLER, 2009; NAGAKURA et al., 2003).

Realizamos inicialmente, a padronização do modelo de inflamação crônica induzida por CFA em camundongos. Em modelos experimentais de dor e inflamação, o CFA vem sendo utilizado como indutor de inflamação crônica, sendo capaz de estabelecer uma condição imunopatológica artrítica semelhante àquela observada em pacientes com artrite reumatoide. Além disto, o CFA como agente inflamatório, é capaz de desencadear edema e aumento da excitabilidade neuronal de forma duradoura (MONTES et al., 2016; ZARINGHALAM et al., 2016).

No presente estudo, foi possível verificar redução do limiar nociceptivo, aumento do volume de pata e rubor desde o primeiro dia após a injeção de CFA, sendo que estes parâmetros se mantiveram durante todo o período de avaliação. Resultados de outros estudos em roedores já demonstraram que os sinais e sintomas inflamatórios podem ser observados por semanas após a injeção do CFA (DJOUHRI et al., 2015; RITTER et al., 2013).

O edema de pata, evidente ao longo de todo o período de avaliação, é resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de proteínas plasmáticas e líquido, bem como, amplificação dos mecanismos inflamatórios resultante da ativação de precursores presentes no plasma (CIRINO, 1998). A alodínia mecânica, por sua vez, é resultado da sensibilização de nociceptores induzida pela alteração do microambiente químico local (pata) durante a resposta inflamatória, bem como, das alterações do processamento nociceptivo em estruturas espinhais e supraespinhais (MILLAN, 1999). Vários estudos demonstraram de forma direta ou indireta que a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos por CFA em roedores são

eventos multimediados que envolvem a participação de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), prostanoídes, óxido nítrico, bradicinina e purinas, entre outros (LIMA *et al.*, 2012; CHOU *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2001; GEGOUT *et al.*, 1994; CUNHA *et al.*, 1992).

Uma vez caracterizados a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pela injeção de CFA, o próximo objetivo foi avaliar os efeitos induzidos pela administração de clindamicina no 1º ou 7º dia após a injeção de CFA sobre essas respostas. Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração de clindamicina (400 mg/kg), no 1º dia após a injeção de CFA, reduziu de forma significativa a alodínia mecânica. Neste mesmo protocolo, a clindamicina nas três doses utilizadas, reduziu significativamente o edema de pata induzido pela injeção de CFA.

A clindamicina, administrada no 7º dia após a injeção de CFA, apresentou marcante atividade, reduzindo de forma dose-dependente a alodínia mecânica e o edema de pata dos animais. Os resultados referentes às atividades antiedematogênica e antialodínica da clindamicina no modelo de inflamação crônica podem estar relacionados com a inibição da produção de citocinas e enzimas inflamatórias. Estudos demonstraram a importância do TNF- $\alpha$  na sensibilização induzida pelo CFA (Von BANCHET *et al.*, 2009; INGLIS *et al.*, 2005). Sabe-se que a administração de CFA desencadeia um processo inflamatório local, envolvendo diversos mediadores que se diferem na fase aguda e crônica da inflamação. As citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são detectadas em baixas concentrações na inflamação aguda induzida por CFA. Todavia, no decorrer do processo inflamatório, estas e outras citocinas apresentam-se em concentrações elevadas. Em conjunto, as citocinas podem estimular a produção de quimiocinas, responsáveis por induzir a migração de linfócitos e macrófagos (ZARINGHALAM *et al.*, 2016; BILLIAU & MATTHYS, 2011; BILLIAU & MATTHYS, 2001).

Nossos resultados demonstraram que a clindamicina, administrada no 7º dia após a injeção de CFA, reduziu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  na pata dos animais. Nossos achados propõem que a atividade antiedematogênica e antialodínica da clindamicina no modelo de dor inflamatória induzida por CFA

se deve, parcialmente, à inibição da ação e/ou síntese de mediadores inflamatórios, como da citocina TNF- $\alpha$ . Há vários estudos demonstrando que o TNF- $\alpha$  é um mediador importante do processamento nociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória. Entre os resultados apresentados nesses estudos, há demonstração das alodínias mecânica e térmica induzidas por TNF- $\alpha$  (WEI et al., 2007; SCHAFERS et al., 2004) e do aumento da concentração dessa citocina na pata de animais após a injeção de diferentes estímulos inflamatórios (PATEL et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013; LORAM et al., 2007). Ritter e colaboradores (2013) demonstraram que a injeção i.pl. de CFA em camundongos, que desencadeia um processo inflamatório crônico, aumenta as concentrações de TNF- $\alpha$  no tecido da pata dos animais no 7º dia após a injeção do estímulo.

Em modelo de choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, Hirata e colaboradores (2001) pré-trataram camundongos com diferentes doses de clindamicina (160, 300 e 440 mg/kg), por via i.p. e avaliaram as concentrações séricas de TNF- $\alpha$ . Os resultados demonstraram que a clindamicina reduz as concentrações de TNF- $\alpha$  e reduz a mortalidade dos animais por choque endotóxico. Embora o modelo experimental e o estímulo neste estudo sejam diferentes, os resultados apresentados corroboram os resultados do presente estudo.

Conforme mencionado no presente estudo, a clindamicina se liga a subunidade 50-S dos ribossomos bacterianos e, conseqüentemente, inibe a síntese proteica (BOOKSTAVER et al., 2015; MURPHY & MCKAY, 2015). De forma semelhante, os antibióticos macrolídeos, os quais também apresentam atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, também se ligam de maneira reversível à subunidade ribossomal 50-S de microrganismos sensíveis, resultando em uma dissociação do RNA transportador dos ribossomos, durante a translocação do RNA mensageiro, de modo a inibir, também, a síntese proteica. Além disso, é relatado que, em células epiteliais, os macrolídeos aumentam as concentrações de AMP cíclico e a elevação deste induz um efeito marcante sobre a produção de citocinas, que inclui inibição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e aumento de IL-10 (CULIC et al., 2001; SCHULTZ et al., 1998).

Nossos resultados mostram que a administração de clindamicina foi capaz de inibir o edema e a alodínia por até 48 h no modelo de inflamação crônica. Ainda, observamos que estes efeitos induzidos pela clindamicina se mantêm com administrações repetidas. Este resultado é relevante principalmente quando se considera que pacientes com processos inflamatórios e dolorosos crônicos são tratados com fármacos por longos períodos. As razões pelas quais este efeito duradouro ocorre ainda são incertas. Relatos de ensaios clínicos sobre o uso de clindamicina em pacientes portadores de malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*, sugerem que a atividade da clindamicina seria mais dependente da duração do tratamento do que da dose (CABRERA et al., 1982; HALL & DOBERSTYN, 1975). Um estudo demonstrou a susceptibilidade *in vitro* de *Plasmodium falciparum* frente a diferentes concentrações de clindamicina. Foi demonstrado que, após o tratamento diário do meio de cultura por até 24 h, a atividade da clindamicina aumentou acentuadamente com o tempo. A porcentagem do efeito contra o protozoário parasita elevou de 20 a 90% entre 42 e 90 horas de incubação. A dependência deste efeito temporal foi justificada pelo efeito acumulativo do fármaco sobre o parasito (SEABERG et al., 1984). Há relatos de que a clindamicina se acumula em neutrófilos e em seus lisossomos, em decorrência do pH intralisossômico ser ácido e esse fármaco se comportar como uma base fraca. Entretanto, esse acúmulo, mesmo em concentrações elevadas, acima de 1,0 mM, não afeta a locomoção dos neutrófilos (KLEMPNER & STYRT, 1983).

Outro ponto que possa justificar parcialmente o efeito prolongado da clindamicina é sua ligação com proteínas plasmáticas. A  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida é a segunda proteína plasmática mais importante ligada ao fármaco após a albumina, além de possuir alta afinidade para fármacos básicos como a clindamicina. Para fármacos ligados a essa proteína plasmática, observa-se um efeito mais prolongado (TSAI et al., 2015).

Com o objetivo de investigar se a atividade antinociceptiva/antialodínica apresentada pela clindamicina poderia resultar de incoordenação motora e/ou relaxamento muscular, avaliou-se o efeito induzido pela clindamicina sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. Uma vez que a



clindamicina não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante, é muito pouco provável que a atenuação do comportamento nociceptivo induzida por esse fármaco nos modelos indicados seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular. Essa observação, além de validar os resultados encontrados, indicam que a redução do comportamento nociceptivo nos modelos experimentais resulta de uma atividade antinociceptiva genuína da clindamicina.

Visando a investigar o papel de receptores opioidérgicos, serotoninérgicos e canabinoidérgicos e também de canais para potássio ATP-dependentes na atividade da clindamicina em modelo de dor nociceptiva induzida por calor, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: naltrexona, ciproheptadina, glibenclamida e AM251.

A naltrexona, antagonista não seletivo de receptores opioides (YADLAPALLI et al., 2016), foi utilizada para investigar se a via opioidérgica poderia mediar a atividade antinociceptiva da clindamicina. A administração prévia de naltrexona inibiu a atividade antinociceptiva da clindamicina, indicando que esse fármaco depende em parte da ativação de vias opioidérgicas. Uma vez que não há demonstração da interação da clindamicina com receptores opioides ou que estimule a liberação de peptídeos opioides endógenos e, considerando que a naltrexona é um antagonista não seletivo de receptores opioides, não é possível inferir qual ou quais receptores ( $\mu$ ,  $\kappa$ , ou  $\delta$ ) medeiam a atividade antinociceptiva desse fármaco. Outros estudos demonstraram a participação da via opioidérgica na atividade antinociceptiva de outras drogas ou fármacos (HONG & ABBOTT, 1995; LEMBECK & DONNERER, 1985).

A ciproheptadina, quando administrada previamente à clindamicina, inibiu sua atividade no modelo de dor nociceptiva. A inibição da atividade da clindamicina nos animais previamente tratados com ciproheptadina indica que esse fármaco poderia interagir com receptores serotoninérgicos ou facilitar a transmissão serotoninérgica, o que poderia contribuir para a atividade antinociceptiva no modelo experimental avaliado. A serotonina é uma amina que possui importante papel no processamento da resposta nociceptiva contribuindo

tanto para a sensibilização de nociceptores no SNP quanto para a inibição da nocicepção no SNC (VIGUIER et al., 2013).

Vários estudos demonstraram que a atividade antinociceptiva de várias drogas é atenuada por bloqueadores de canais para potássio ATP-dependentes, como a glibenclamida, em diversos modelos experimentais de dor (KHANNA et al., 2011; LIMA et al., 2010; ALVES et al., 2004; ALVES & DUARTE, 2002). No presente estudo, no entanto, a glibenclamida não atenuou a atividade antinociceptiva da clindamicina. Esse resultado indica que canais para potássio sensíveis ao ATP não devem ser relevantes para a expressão da atividade antinociceptiva da clindamicina.

Em seguida, o antagonista de receptores canabinoides CB1 (AM251) (GUHRING et al., 2002) foi usado com o objetivo de investigar se a via canabinoidérgica poderia mediar a atividade antinociceptiva da clindamicina. É amplamente conhecido que a atividade antinociceptiva de várias drogas ou fármacos é revertida por antagonistas canabinoidérgicos (SCHREIBER et al., 2012; GUINDON et al., 2006; GUHRING et al., 2002). Entretanto, a administração prévia de AM251 não alterou a atividade antinociceptiva da clindamicina, o que indica que mecanismos canabinoidérgicos, via CB1, não são relevantes para a expressão dessa atividade no modelo experimental usado.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a clindamicina apresenta atividade em modelos de dores inflamatória e nociceptiva e também em modelo de inflamação crônica. Em modelo de inflamação crônica, as atividades antiedematogênica e antialodínica foram demonstradas mesmo após o estabelecimento da sensibilização e do edema de pata, provavelmente relacionadas com efeitos sobre a produção e/ou ação de mediadores inflamatórios. Os resultados indicam que a atividade antinociceptiva envolve a ativação de mecanismos serotoninérgicos e opiodérgicos. Esses achados indicam que a clindamicina possui potencial para ser reposicionada para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas.

## 8 REFERÊNCIAS

AL AHDAL, O.; BEVAN, D. R. Clindamycin-induced neuromuscular blockade. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 42, p. 614-617, 1995.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrene. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, p. 47-52, 2002.

ALVES, D. P.; TATSUO, M. A.; LEITE, R.; DUARTE, I. D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels activation. **Life Sciences**, v. 74, p. 2577-2591, 2004.

AMIN, B.; HAJHASHEMI, V.; HOSSEINZADEH, H.; ABNOUS, K. H. Antinociceptive evaluation of ceftriaxone and minocycline alone and in combination in a neuropathic pain model in rat. **Neuroscience**, v. 08, p. 15-25, 2012.

ANDRADE, F. A.; PEREIRA, L. V.; SOUSA, F. A. E. F. Mensuração da dor no idoso: uma revisão. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 14, p. 271-276, 2006.

AOKI, Y.; TSUBOTA, M.; NISHIMOTO, Y.; MAEDA, Y.; SEKIGUCHI, F.; KAWABATA, A. Selective sensitization of C-fiber nociceptors by hydrogen sulfide. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 130, p. 38-41, 2016.

ARACHCHILLAGE, D. R.; MAKRIS, M. Choosing and using non-steroidal anti-inflammatory drugs in haemophilia. **Haemophilia**, v. 22, p. 179-187, 2015.

ASCASO, F. J.; HUERVA, V.; GRZYBOWSKI, A. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Macular Edema Secondary to Retinal Vascular Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 01-06, 2014.

ATRETKHANY, K. N.; DRUTSKAYA, M. S.; NEDOSPASOV, S. A.; GRIVENNIKOV, S. I.; KUPRASH, D. V. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 168, p. 98-112, 2016.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. **Current Biology**, v.09, p. 29-31, 1999.

BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. M. Drug repositioning: playing dirty to kill pain. **CNS Drugs**, v. 28, p. 45-61, 2014.

BEHR, M. A.; DIVANGAHI, M. Freund's adjuvant, NOD2 and mycobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 126-132, 2015.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is autoimmune, how much is auto-inflammatory? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 339-344, 2011.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 849-860, 2001.

BOOKSTAVER, P. B.; BLAND, C. M.; GRIFFIN, B.; STOVER, K. R.; EILAND, L. S.; MCLAUGHLIN, M. A review of antibiotic use in pregnancy. **Pharmacotherapy**, v. 35, p. 1052-1162, 2015.

BÖTTCHER, T.; REN, H.; GOINY, M.; GERBER, J.; LYKKESFELDT, J.; KUHN, U.; LOTZ, M.; BUNKOWSKI, S.; WERNER, C.; SCHAU, I.; SPREER, A.; CHRISTEN, S.; NAU, R. Clindamycin is neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, p. 1450-1460, 2004.

BOUMPAS, D. T.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L.; CUPPS, T. R.; BALOW, J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, p. 1198-1208, 1993.

BURMA, N. E.; LEDUC-PESSAH, H.; FAN, C. Y.; TRANG, T. Animal models of chronic pain: advances and challenges for clinical translation. **Journal of Neuroscience Research**, doi: 10.1002/jnr.23768, 2016.

BURTON, A. R.; FAZALBHOY, A.; MACEFIELD, V. G. Sympathetic responses to noxious stimulation of muscle and skin. **Frontiers in Neurology**, v. 07, p. 109, 2016.

CABRERA, B. D.; RIVERA, D. G.; LARA, N. T. Study on clindamycin in the treatment of falciparum malaria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 62-69, 1982.

CACHOVAN, G.; BÖGER, R. H.; GIERSDORF, I.; HALLIER, O.; STREICHERT, T.; HADDAD, M.; PLATZER, U.; SCHÖN, G.; WEGSCHEIDER, K.; SOBOTTKA, I. Comparative efficacy and safety of moxifloxacin and clindamycin in the treatment of odontogenic abscesses and inflammatory infiltrates: a phase II, double-blind, randomized trial. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 1142-1147, 2011.

CARRASCO-PORTIGAL, C. M.; LUJÁN, M.; FLORES-MURRIETA, F. J. Evaluation of gender in the oral pharmacokinetics of clindamycin in humans. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 29, p. 227-230, 2008.

CHEEKAVOLU, C.; MUNIAPPAN, M. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of indazole and its derivatives. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, p. 01-06, 2016.

CHEN, M. H.; CHANG, P. M.; CHEN, P. M.; TZENG, C. H.; CHU, P. Y.; CHANG, S. Y. Prolonged facial edema is an indicator of poor prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Support Care Cancer**, v. 18, p. 1313-1319, 2010.

CHONG, C. R.; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, p. 645-646, 2007.

CHOU, L. W.; WANG, J.; CHANG, P. L.; HSIEH, Y. L. Hyaluronan modulates accumulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinase-3 in the synovium of rat adjuvant-induced arthritis model. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, R. 90, 2011.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation: extracellular and intracellular phospholipase A<sub>2</sub> inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 105-111, 1998.

CLARKE, H.; SONEJI, N.; KO, D. T.; YUN, L.; WIJEYSUNDERA, D. N. Rates and risk factors for prolonged opioid use 297 after major surgery: population based cohort study. **BMJ**, v. 348, doi: 10.1136/bmj.g1251, 2016.

CORNISH, B. H.; CHAPMAN, M.; MIROLO, C. H.; BUNCE, I. H.; WARD, L. C.; THOMAS B. J. Early diagnosis of lymphedema using multiple frequency bioimpedance. **Lymphology**, v. 34, p. 02-11, 2001.

COX, F. Basic principles of pain management: assessment and intervention. **Nursing Standard**, v. 25, p. 36-39, 2010.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology** v. 42, n. 03, p. 392-402, 1971.

CULIC, O.; ERAKOVIC, V.; PARNHAM, M. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 209-229, 2001.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 1755-1760, 2005.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behavior and Immunity**, v. 24, p. 1035-1042, 2010.

DE KLOET, E. R.; SUTANTO, W.; VAN DEN BERG, D. T.; CAREY, M. P.; VAN HAARST, A. D.; HORNSBY, C. D.; MEIJER, O. C.; ROTS, N. Y.; OITZL, M. S. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, p. 183-190, 1993.

DJOUHRI, L. A $\delta$ -fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in relation to A $\delta$ -fiber high threshold mechanoreceptors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 61, p. 225-238, 2016.

DJOUHRI, L.; AL OTAIBI, M.; KAHLAT, K.; SMITH, T.; SATHISH, J.; WENG, X. Persistent hindlimb inflammation induces changes in activation properties of hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in rat C-fiber nociceptors in vivo. **Neuroscience**, v. 301, p. 121-133, 2015.

DREWES, A. M. The physiology of pain. **Ugeskrift for Laeger**, v.168, n. 20, p. 1941-1943, 2006.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3760-3772, 2010.

DUFFY, L.; O'REILLY, S. C. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: recent and emerging translational developments. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 05, p. 69-80, 2016.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

ELLIOTT, A. M.; SMITH, B. H.; PENNY, K. I.; SMITH, W. C.; CHAMBERS, W. A. The epidemiology of chronic pain in the community. **The Lancet**, v. 354, p. 1248-1252, 1999.

ELLIS, D. Pathophysiology, evaluation and management of edema in childhood nephrotic syndrome. **Frontiers in Pediatrics**, v. 03, p. 01-10, 2016.

EL-TAHAN, R. R.; GHONEIM, A. M.; EL-MASHAD, N. TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. **Springerplus**, v. 05, p. 1508, 2016.

FARDET, L.; FLAHAULT, A.; KETTANEH, A.; TIEV, K. P.; GÉNEREAU, T.; TOLÉ; DANO, C.; LEBBÉ, C.; CABANE, J. Corticosteroid-induced clinical adverse events: frequency, risk factors and patient's opinion. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 142-148, 2007.

FARIDAALAEI, G.; MOHAMMADI, N.; MERGHATI, S. Z.; KEYGHOBADI KHAJEH, F.; NAGHIPOUR, B.; POURAGHAEI, M.; AHMADI, S. Intravenous morphine vs intravenous ketofol for treating renal colic; a randomized controlled trial. **Emergency**, v. 04, p. 202-206, 2016.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PESQUERO, J. B.; ARAÚJO, R. C.; 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. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 1006-1012, 2001.



FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FILLINGIM, R. B.; LOESER, J. D.; BARON, R.; EDWARDS, R. R. Assessment of chronic pain: domains, methods, and mechanisms. **The Journal of Pain**, v. 17, p. 10-20, 2016.

FRANCISCHI, J.N.; YOKORO, C.M.; POOPLE, S.; TAFURI, W.L.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 399, p. 243-249, 2008.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, p. 321-326, 1994.

GENDRON, L.; CAHILL, C. M.; VON ZASTROW, M.; SCHILLER, P. W.; PINEYRO, G. Molecular pharmacology of  $\delta$ -opioid receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 631-700, 2016.

GIUGNO, C. S.; SILVA, A. L.; FUHRICH, D. G.; RABAIOLI, P. S.; GONÇALVES, K. G.; SARTOR, N. C.; SAVARIS, F. R. Daily dose of clindamycin versus standard divided doses in obstetrical and gynecological infections: a retrospective cohort study. **International Journal of STD & AIDS**, v. 24, p. 893-898, 2013.

GODIN, A. M.; ARAÚJO, D. P.; CÉSAR, I. C.; MENEZES, R. R.; BRITO, A. M.; MELO, I. S. F.; COURA, G. M. E.; BASTOS, L. F. S.; ALMEIDA, M. O.; BYRRO, R. M. D.; MATSUI, T. C.; BATISTA, C. R. A.; PIANETTI, G. A.; FÁTIMA, A.; MACHADO, R. R.; COELHO, M. M. Activities of 2-phthalimidethyl nitrate and 2-phthalimidethanol in the models of nociceptive response and edema induced by formaldehyde in mice and preliminary investigation of the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 05, p. 59-66, 2015.

GODIN, A. M.; ARAÚJO, D. P.; MENEZES, R. R.; BRITO, A. M.; MELO, I. S.; COURA, G. M.; SOARES, D. G.; BASTOS, L. F.; AMARAL, F. A.; RIBEIRO, L. S.; BOFF, D.; SANTOS, J. R.; SANTOS, D. A.; TEIXEIRA, M. M.; DE FÁTIMA, Â.; MACHADO, R. R.; COELHO, M. M. Activities of 2-phthalimidethanol and 2-phthalimidethyl nitrate, phthalimide analogs devoid of the glutarimide moiety, in experimental models of inflammatory pain and edema. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 122, p. 291-298, 2014.

GONZALEZ, D.; MELLONI, C.; YOGEV, R.; POINDEXTER, B. B.; MENDLEY, S. R.; DELMORE, P.; SULLIVAN, J. E.; AUTMIZGUINE, J.; LEWANDOWSKI, A.; HARPER, B.; WATT, K. M.; LEWIS, K. C.; CAPPARELLI, E. V.; BENJAMIN JR., D. K.; COHEN-WOLKOWIEZ, M. Use of opportunistic clinical data and a population pharmacokinetic model to support dosing of clindamycin for premature infants to adolescents. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 94, p. 429-437, 2014.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 05, p. 963-991, 1990.

GÖRANSSON, K. E.; HEILBORN, U.; DJÄRV, T. Patients' perspectives on the insufficiency of scales to rate their pain in the ED. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 34, p. 2246-2247, 2016.

GÜHRING, H.; HAMZA, M.; SERGEJEVA, M.; ATES, M.; KOTALLA, C. E.; LEDENT, C.; BRUNE, K. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, p. 153-63, 2002.

GUINDON, J.; DE LÉAN, A.; BEAULIEU, P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. **Pain**, v. 121, p. 85-93, 2006.

HALL, A. P.; DOBERSTYN, E. B. NANAKORN, A.; SONKOM, P. Falciparum malaria semi-resistant to clindamycin. **British Medical Journal**, v. 02, p. 12-14, 1975.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HIRATA, N.; HIRAMATSU, K.; KISHI, K.; YAMASAKI, T.; ICHIMIYA, T.; NASU, M. Pretreatment of mice with clindamycin improves survival of endotoxic shock by modulating the release of inflammatory cytokines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2638-2642, 2001.

HIRATA, T.; NARUMIYA, S. Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. **Advances in Immunology**, v. 116, p. 143-174, 2012.

HONG, Y.; ABBOTT, F. V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, p. 21-28, 1995.

HU, Y.; LI, W.; LU, L.; CAI, J.; XIAN, X.; ZHANG, M.; QINGJUN, LI.; LI, LI. An antinociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. **Pain**, v. 148, p. 284–301, 2010.

HUANG, L.; ZHANG, B.; YANG, Y.; GONG, X.; CHEN, Z.; WANG, Z.; ZHANG, P.; ZHANG, Q. Synthesis and anti-inflammatory activity of paeonol analogues in the murine model of complete Freund's adjuvant induced arthritis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 5218-5221, 2016.

HUDMON, A.; CHOI, J. S.; TYRRELL, L.; BLACK, J. A.; RUSH, A. M.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. Phosphorylation of sodium channel Na (v) 1.8 by p38 mitogenactivated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n 12, p. 3190-3201, 2008.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IANARO, A.; O'DONNELL, C. A.; DI ROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, downregulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, p. 370-375, 1994.

INGLIS, J. J.; NISSIM, A.; LEES, D. M.; HUNT, S. P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B. L. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 07, p. 807-816, 2005.

KANAZAWA ,T.; ENDO, T.; ARIMA, N.; IBARAKI, H.; TAKASHIMA, Y.; SETA, Y. Systemic delivery of small interfering RNA targeting nuclear factor κB in mice with collagen-induced arthritis using arginine-histidine-cysteine based oligopeptide-modified polymer nanomicelles. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, p. 315-323, 2016.

KAWAHARA, K.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 414-421, 2015.

KHANNA, N.; MALHOTRA, R. S.; MEHTRA, A. K.; GARG, G. R.; HALDER, S.; SHARMA K. K. Interaction of morphine and potassium channel openers on experimental models of pain in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 479-484, 2011.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p.01-12, 2008.

KLEMPNER, M. S.; STYRT, B. Alkalinization of the intralysosomal pH by clindamycin and its effects on neutrophil function. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, p. 39-50, 1983.

KONOPKA, L. M.; PARSONS, R. L. Clindamycin induced alteration of ganglionic function. I. Direct effects on ganglion cell properties. **Brain Research**, v. 458, p. 269-277, 1988.

KUWAHARA, K.; KITAZAWA, T.; KITAGAKI, H.; TSUKAMOTO, T.; KIKUCHI, M. Nadifloxacin, an antiacne quinolone antimicrobial, inhibits the production of proinflammatory cytokines by human peripheral blood mononuclear cells and normal human keratinocytes. **Journal of Dermatology Science**, v. 38, p. 47-55, 2005.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, S. I.; LEE, J. H.; LEE, S. C.; LEE, J. M.; LEE, J. H. Calcium and neostigmine antagonize gentamicin, but augment clindamycin-induced tetanic fade in rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. **Journal of Anesthesia**, v. 22, p. 385-390, 2008.

LEMBECK, F.; DONNERER, J. Opioid control of the function of primary afferent substance P fibres. **European Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 241-246, 1985.

LIMA, F. O.; SOUZA, G. R.; VERRI, W. A. JR.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. **Pain**, v. 151, p. 506-515, 2010.

LIMA, M. D.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SANTANA, W. A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvedilol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p.112–117, 2012.

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features versus adverse biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 27-36, 2015.

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

LOH, H. H.; TSENG, L. F.; WEI, E.; LI, C. H. Beta-endorphin is a potent analgesic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 2895-2898, 1976.

LÓPEZ-UREÑA, D.; QUESADA-GÓMEZ, C.; MONTOYA-RAMÍREZ, M.; DEL MAR, G. C. M.; SOMOGYI, T.; RODRÍGUEZ, C.; RODRÍGUEZ-CAVALLINI, E. Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, p. 01-05, 2016.

LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; CARTMEEL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Journal of Pain**, v. 08, p. 127-136, 2007.

LOREDO, P. A. A.; MONTALVO, B. C. E.; HERNÁNDEZ, G. L. I.; ANAYA, R. M.; FERNÁNDEZ, V. L. C.; REYES, G. J. G.; ACOSTA, G. R. I.; MARTÍNEZ, M. A.; VILLARREAL, S. J. C.; VARGAS, M. V. M.; MUÑOZ, I. E.; RAMÍREZ, R. M. B.; JIMÉNEZ, A. J. M. High-fat diet exacerbates pain-like behaviors and periarticular bone loss in mice with CFA-induced knee arthritis. **Obesity**, v. 24, p. 1106-1115, 2016.

MAIXNER, W.; FILLINGIM, R. B.; WILLIAMS, D. A.; SMITH, S. B.; SLADE, G. D. Overlapping chronic pain conditions: implications for diagnosis and classification. **The Journal of Pain**, v. 17, p. 93-107, 2016.

MCCLEANE, G. Topical analgesics. **Medical Clinics of North America**, v. 91, p. 125-139, 2007.

MCINNES, I., B.; BUCKLEY, C. D.; ISAAC, J. D. Cytokines in rheumatoid arthritis – shaping the immunological landscape. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, p. 63-68, 2016.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 2209-2219, 2011.

MCMAHON, S. B.; LA RUSSA, F.; BENNETT, D. L. H. Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 389-402, 2015.

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

MESDJIAN, E.; DeFEUDIS, F. V.; VALLI, M.; JADOT, G.; MANDEL, P. Antinociceptive action of sodium valproate in the mouse. **General Pharmacology**, v. 14, p. 697-699, 1983.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v. 46, p. 142-153, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 01-164, 1999.

MONTES, G. C.; HAMMES, N.; DA ROCHA, M. D.; MONTAGNOLI, T. L.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Treatment with adenosine receptor agonist ameliorates pain induced by acute and chronic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 358, p. 315-323, 2016.

MORTIMER, K. J.; TATTERSFIELD, A. E. Benefit versus risk for oral, inhaled, and nasal glucocorticosteroids. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 25, p. 523-539, 2005.

MURPHY, C. S.; MCKAY, G. Clindamycin. **Practical diabetes**, v. 32, p. 222-223, 2015.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 490-497, 2003.  
NAKAGAWA, T.; MUKAIYAMA, H.; YURIMOTO, H.; SAKAI, Y.; KATO, N. Alcohol oxidase hybrid oligomers formed in vivo and in vitro. **Yeast**, v. 15, p. 1223-1230, 1999.

NGUYEN, A.; EICHENFIELD, L. F. Profile of clindamycin phosphate 1.2%/benzoyl peroxide 3.75% aqueous gel for the treatment of acne vulgaris. **Clinical, Cosmetic**

**and Investigational Dermatology**, v. 08, p. 549-554, 2015.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; MACHADO, A.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; BRENOL, J. C.; PETRONILHO, F.; ROESLER, R.; DAL-PIZZOL, F.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, R. M. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Peptides**, v. 29, p. 1726-1731, 2008.

OLIVEIRA, R. G. Antimicrobianos-Infectologia. In: **Black book, clínica médica**. 2<sup>th</sup> ed. Belo Horizonte, p. 150, 2014.

PARASCHIV-IONESCU, A.; PERRUCHOUD, C.; RUTSCHMANN, B.; BUCHSER, E.; AMINIAN, K. Quantifying dimensions of physical behavior in chronic pain conditions. **Journal of Neuro Engineering and Rehabilitation**, v. 13, p. 01-10, 2016.

PASCHIKIS, Z.; POTTER, M. L. CE: Acute pain management for inpatients with opioid use disorder. **The American Journal of Nursing**, v. 115, p. 24-32, 2015.

PATEL, R. B.; PAWAR, V. D.; PRAJAPATI, K. D.; SONARA, B. M.; DESHPANDE, S. S.; SHAH, G. B.; JAIN, M. R. Anti-nociceptive and anti-allodynic activity of aliskiren in various pain models. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, p. 80-87, 2013.

PINEDA, L. C.; WATT, K. M. New antibiotic dosing in infants. **Clinics Perinatoly**, v. 42, p. 167-176, 2015.

PIZZI, L. T.; TONER, R.; FOLEY, K.; THOMSON, E.; CHOW, W.; KIM, M.; COUTO, J.; ROYO, M.; VISCUSI, E. Relationship between potential opioid-related adverse effects and hospital length of stay in patients receiving opioids after orthopedic surgery. **Pharmacotherapy**, v. 32, p. 502-514, 2012.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.

RAVAL, N. D.; RAVISHANKAR, B.; ASHOK, B. K. Anti-inflammatory effect of *Chandrashura* (*Lepidium sativum* Linn.) an experimental study. **AYU**, v. 34, p. 302-304, 2013.

RICHARDSON, W. L.; HAMMERT, W. C. Adverse effects of common oral antibiotics. **Journal of Hand Surgery**, v. 39, p. 989-991, 2014.

RITTER, A. M.; DOMICIANO, T. P.; VERRI, W. A. JR.; ZARPELON, A. C.; DA SILVA, L. G.; BARBOSA, C. P.; NATALI, M. R.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, p. 187-197, 2013.

RITTNER H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 1215-1222, 2005.

ROCHA, A. C. C.; FERNANDES, E. S.; QUINTÃO, N. L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Relevance of tumor necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 688-695, 2006.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Modification of the antinociceptive effect of morphine by acute and chronic administration of clomipramine in mice. **Pain**, v. 33, p. 349-355, 1988.

SALLUM, A. M. C.; GARCIA, D. M.; SANCHES, M. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, p. 150-154, 2012.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SAMAD, T. A.; MOORE, K. A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J. V.; WOLF, C. J. Interleukin-1-beta mediated



induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-475, 2001.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 707-758, 2009.

SANTOS, J. I.; ARBO, A.; PAVIA, N. In vitro and in vivo effects of clindamycin on polymorphonuclear leukocyte function. **Clinical Therapeutics**, v. 14, p. 578-594, 1992.

SATO, T.; SHIRANE, T.; NOGUCHI, N.; SASATSU, M.; ITO, A. Novel anti-acne actions of nadifloxacin and clindamycin that inhibit the production of sebum, prostaglandin E (2) and promatrix metalloproteinase-2 in hamster sebocytes. **Journal of Dermatology**, v. 39, p. 774-780, 2012.

SATOH, M.; MINAMI, M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, p. 343-364, 1995.

SCHÄFERS M.; MARZINIAK, M.; SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L.; SOMMER, C. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Experimental Neurology**, v. 185, p. 160-168, 2004.

SCHULTZ, M. J.; SPEELMAN, P.; ZAAT, S.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN DER POLL, T. Erythromycin inhibits tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production induced by heat-killed *Streptococcus pneumoniae* in whole blood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1605-1609, 1998.

SCHREIBER A. K.; NEUFELD, M.; JESUS, C. H.; CUNHA, J. M. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 1286-1297, 2012.

SEABERG, L. S.; PARQUETTE, A. R.; GLUZMAN, I. Y.; PHILLIPS, G. W. JR.; BRODASKY, T. F.; KROGSTAD, D. J. Clindamycin activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 150, p. 904-911, 1984.

SENNA, E. R.; DE BARROS, A. L.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V.; CICONELLI, R. M. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: A study using the copcord approach. **Journal of Rheumatology**, v. 31, p. 594-597, 2004.

SEPEHRI, Z.; FERREIDONI, M.; NIAZMAND, S. Role of C-fibers during acute and chronic stress on formalin-induced paw edema in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 633-637, 2012.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHOUVAL, D. S.; BISWAS, A.; KANG, Y. H.; GRIFFITH, A. E.; KONNIKOVA, L.; MASCANFRONI, I. D.; REDHU, N. S.; FREI, S. M.; FIELD, M.; DOTY, A. L.; GOLDSMITH, J. D.; LOIZIDES, A.; WEISS, B.; YERUSHALMI, B.; YANAGI, T.; QUINTANA, F. J.; MUISE, A. M.; KLEIN, C.; HORWITZ, B. H.; GLOVER, S. C.; BOUSVAROS, A.; SNAPPER, S. B. Interleukin 1 beta mediates intestinal inflammation in mice and patients with il10 receptor deficiency. **Gastroenterology**, v. 151, p. 1100-1104, 2016.

SILVEIRA K. D.; COELHO, F. M.; VIEIRA, A. T.; BARROSO, L. C.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; COSTA, V. V.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, M. L.; BADER, M.; SILVA, T. A.; SANTOS, R. A.; SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. **Peptides**, v. 46, p. 53-63, 2013.

SMITH, A.; DORÉ, C.; CHARLES, P.; VALLANCE, A.; POTIER, T.; MACKWORTH-YOUNG, C. Randomised double-blind trial of combination antibiotic therapy in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatology**, v. 2011, p. 01-06, 2011.

SOARES, D. G.; GODIN, A. M.; MENEZES, R. R.; NOGUEIRA, R. D.; BRITO, A. M.; MELO, I. S.; COURA, G. M.; SOUZA, D. G.; AMARAL, F. A.; PAULINO, T. P.; COELHO, M. M.; MACHADO, R. R. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of azadirachtin in mice. **Planta Medica**, v. 80, p. 630-636, 2014.

SOLHI, H.; SANAEI-ZADEH, H.; SOLHI, S.; AZIZI, N. M. A.; GHARIBI, M. SADEGHI, S. B. Meperidine (pethidine) versus morphine in acute pain management of opioid-dependent patients. **Journal of Open Access Emergency Medicine**, v. 31, p. 57-59, 2016.

SONG, I. H.; GOLD, R.; STRAUB, R. H.; BURMESTER, G. R.; BUTTGEREIT, F. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! **The Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 1199-1207, 2005.

TOBIAS, J. D.; GREEN, T. P.; COTÉ, C. J. Codeine: time to say "No". **Pediatrics**, v. 138, p. 01-07, 2016.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531-543, 1998.

TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 05 -17, 1992.

TSAI, D.; JAMAL, J. A.; DAVIS, J. S.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J. A. Interethnic differences in pharmacokinetics of antibacterials. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, p. 243-260, 2015.

VALÉRIO, D. A.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; DA COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 562, p. 155-163, 2007.

VAZQUEZ, E.; NAVARRO, M.; SALAZAR, Y.; CRESPO, G.; BRUGES, G.; OSORIO, C.; TORTORICI, V.; VANEGAS, H.; LÓPEZ M. Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. **Inflammation Research**, v. 64, p. 333-342, 2015.

VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6- dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

VIGUIER, F.; MICHOT, B.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 08-16, 2013.

VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, p. 171-197, 2008.

VON BANCHET, S.G.; BOETTGER, M. K.; FISCHER, N.; GAJDA, M.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H. G. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. **Pain**, v. 145, p. 151-159, 2009.

WALTERS, K. M.; WOESSNER, K. M. An overview of nonsteroidal antiinflammatory drug reactions. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 36, p. 625-641, 2016.

WANG, T. X.; YIN, D.; GUO, W.; LIU, Y. Y.; LI, Y. D.; QU, W. M.; HAN, W. J.; HONG, Z. Y.; HUANG, Z. L. Antinociceptive and hypnotic activities of pregabalin in a neuropathic pain-like model in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 135, p. 31-39, 2015.

WANG, X.; GRACE, P. M.; PHAM, M. N.; CHENG, K.; STRAND, K. A.; SMITH, C.; LI, J.; WATKINS, L. R.; YIN, H. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. **Journal FASEB**, v. 27, p. 2713-2722, 2013.

WEI X. H.; ZANG, Y.; WU, C. Y.; XU, J. T.; XIN, W. J.; LIU, X. G. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. **Experimental Neurology**, v. 205, p. 471- 484, 2007.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WITTMANN, S.; ARLT, M.; ROTHE, G.; FRÖHLICH, D. Differential effects of clindamycin on neutrophils of healthy donors and septic patients. **Internationial Immunopharmacology**, v. 04, p.929-937, 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1769, 2000.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

WRIGHT, A. P.; ZILLIACUS, J.; MCEWAN, I. J.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ALMLÖF, T.; CARLSTEDT DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A. Structure and function of the glucocorticoid receptor. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, p. 09-11, 1993.

WYNALDA, M. A.; HUTZLER, J. M.; KOETS, M. D.; PODOLL, T.; WIENKERS, L. C. In vitro metabolism of clindamycin in human liver and intestinal microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 878-887, 2003.

YADLAPALLI, J. S.; FORD, B. M.; KETKAR, A.; WAN, A.; PENTHALA, N. R.; EOFF, R. L.; PRATHER, P. L.; DOBRETSOV, M.; CROOKS, P. A. Antinociceptive effects of the 6-O-sulfate ester of morphine in normal and diabetic rats: Comparative role of mu- and delta-opioid receptors. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 335-347, 2016.

YAMATO, K.; KATAOKA, T.; NISHIYAMA, Y.; TAGUCHI, T.; YAMAOKA, K. Antinociceptive effects of radon inhalation on formalin-induced inflammatory pain in mice. **Inflammation**, v. 36, p. 355-363, 2013.

YI DAY. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, p. 277-291, 2015.

ZARINGHALAM, J.; AKBARI, A.; ZALI, A.; MANAHEJI, H.; NAZEMIAN, V.; SHADNOUSH, M.; EZZATPANAH, S. Long-term treatment by vitamin B1 and reduction of serum proinflammatory cytokines, hyperalgesia, and paw edema in adjuvant-induced arthritis. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 07, p. 331-340, 2016.

ZHANG, H.; ZHANG, Y. Q.; QIU, Z. B.; ZHAO, Z. Q. Inhibitory effect of intrathecal meptazinol on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 356, p. 09-12, 2004.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

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