

CARYNE MARGOTTO BERTOLLO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA
RIBOFLAVINA EM DIFERENTES
MODELOS DE NOCICEPÇÃO E
INFLAMAÇÃO

Belo Horizonte
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
2006

CARYNE MARGOTTO BERTOLLO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA RIBOFLAVINA EM DIFERENTES MODELOS DE NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Márcio M. Coelho

Belo Horizonte
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
2006

*Existem apenas duas maneiras de ver a vida.
Uma é pensar que não existem milagres
e a outra é que tudo é um milagre.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Ao Prof. Márcio de Matos Coelho, um grande amigo e um verdadeiro professor.

Aos amigos do laboratório, Antônio Carlos, Karina, Leonardo, Elias, Adriano, Flávia, Kellen, Dorothea, Leonardo Merlo, Leandro e Adriana pela amizade, pelo carinho e por tudo o que me ensinaram.

À médica veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao funcionário José Batista Viturino, pela colaboração e amizade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do ICB e aos bibliotecários da Faculdade de Farmácia, do ICB e da Biblioteca Central.

Ao meu pai, a minha mãe, aos meus irmãos Giovanni e Rossano e as minhas "irmãs" Luciana e Suellem, por todo o amor, apoio e incentivo.

Ao Alisson e aos seus familiares, pelo carinho e apoio.

Aos animais de laboratório, com um pedido de desculpas.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

RESUMO

A riboflavina é uma vitamina do complexo B que é convertida em FMN e FAD, coenzimas que participam de diversas reações do metabolismo energético. A riboflavina, assim como outras vitaminas do complexo B (tiamina, piridoxina e cianocobalamina), apresenta atividade antiinflamatória, embora uma caracterização ampla da mesma ainda não tenha sido realizada. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito dessa vitamina em modelos de nocicepção e inflamação. A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) não alterou a atividade motora de camundongos nos modelos da haste girante e do campo aberto. A segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos foi inibida pelo tratamento com a riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p.). A primeira fase dessa resposta, bem como a resposta nociceptiva induzida por calor no modelo da placa quente, foi inibida apenas pela maior dose dessa vitamina. A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.), administrada 30 min antes ou 3 h após a injeção i.pl. de carragenina em ratos, não inibiu a alodínia mecânica. Entretanto, a administração da riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.), imediatamente e 2 h após a injeção de carragenina, induziu efeito antinociceptivo. Esse efeito não foi inibido pelo pré-tratamento dos animais com sulfato de cádmio (1 mg/kg, i.p.), um inibidor da flavoquinase. O edema de pata induzido por carragenina em ratos também foi inibido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., 0 e 2 h). Entretanto, a migração celular induzida pela injeção i.p. desse estímulo inflamatório em ratos não foi reduzida pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg, s.c., 0 e 2 h). Os efeitos induzidos por essa vitamina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., 0 e 2 h) sobre dois componentes da resposta inflamatória induzida por PDD em ratos foram diferentes. Embora não tenha inibido a alodínia mecânica, a riboflavina (100 mg/kg, i.p.) inibiu, parcialmente, o edema de pata induzido por esse estímulo. A riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p., 0 e 2h) também inibiu a resposta febril induzida por LPS em ratos, um modelo de inflamação sistêmica. Além disso, no modelo de formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão em camundongos, um modelo de inflamação prolongada, o tratamento durante uma semana com duas doses diárias de riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p.) reduziu a massa do tecido fibrovascular. Além de apresentar atividade antinociceptiva, antiedema, antipirética e antiproliferativa quando administrada de forma isolada, a riboflavina (10 ou 25 mg/kg, i.p.) exacerbou o efeito da morfina (2, 4 ou 8 mg/kg, i.p.) no modelo de resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos. Em conclusão, o presente estudo demonstrou os efeitos antinociceptivo e antiinflamatório da riboflavina em diferentes modelos experimentais, sendo que tais efeitos resultam, provavelmente, de múltiplos mecanismos. Esses resultados, associados ao fato de que a riboflavina é uma droga aprovada para uso clínico, apresenta segurança bem estabelecida e aumenta o efeito antinociceptivo da morfina, podem dar suporte a estudos clínicos que avaliem o uso dessa vitamina em condições patológicas não associadas a sua deficiência.

PALAVRAS CHAVES: riboflavina, inflamação, dor, nocicepção, edema, febre, migração celular, tecido fibrovascular.

SUMMARY

Riboflavin is a member of the vitamin B complex that is converted to FMN and FAD, coenzymes that participate in many reactions of energy metabolism. Recent studies have shown that riboflavin, similar to other vitamins of the B complex (thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin), presents anti-inflammatory activity but its full characterization has not yet been carried out. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of this vitamin in different models of nociception, edema, cell migration, fever and formation of fibrovascular tissue. Riboflavin (25, 50 or 100 mg/kg, i.p.) did not alter the motor activity of mice in the rota-rod or the open field tests. The second phase of the nociceptive response induced by formaldehyde in mice was inhibited by riboflavin (50 or 100 mg/kg). The first phase of this response and the nociceptive behavior induced by heat in the hot plate model were inhibited only by the highest dose of this vitamin. Riboflavin (25, 50 or 100 mg/kg, i.p.), administered 30 min before or 3 h after i.p. injection of carrageenan in rats, did not inhibit mechanical allodynia. However, when administered immediately and 2 h after the injection of carrageenan, riboflavin induced antinociceptive effect. This effect was not inhibited by the pre-treatment with cadmium sulphate (1 mg/kg), an inhibitor of flavokinase. Riboflavin (25, 50 or 100 mg/kg, i.p., 0 and 2 h) also inhibited the paw edema induced by carrageenan in rats. However, the cell migration induced by i.p. injection of this stimulus in rats was not inhibited by riboflavin (25, 50 or 100 mg/kg, i.p., 0 and 2 h). This vitamin induced different effects on two components of the inflammation induced by PDD. Riboflavin (25, 50 or 100 mg/kg, i.p., 0 and 2 h) partially inhibited the paw edema, but not the mechanical allodynia induced by this stimulus. Riboflavin (50 or 100 mg/kg, i.p.) also inhibited the febrile response induced by LPS in rats. Moreover, in the model of fibrovascular tissue formation induced by a s.c. implant of a cotton pellet, riboflavin (50 or 100 mg/kg, i.p.) reduced the mass of fibrovascular tissue when administered twice a day for one week. Besides the antinociceptive, antiedematogenic, antipyretic, and antiproliferative effects induced by riboflavin when administered alone, this vitamin (10 or 25 mg/kg, i.p.) exacerbated the effect of morphine (2, 4 or 8 mg/kg, i.p.) in the model of nociceptive response induced by formaldehyde in mice. In conclusion, the present study demonstrates the antinociceptive and anti-inflammatory activities of riboflavin in different experimental models, which probably result from multiple mechanisms. These results, associated with the fact that riboflavin is a safe drug, approved for clinical use and exacerbates the antinociceptive effect induced by morphine, may warrant clinical trials to assess its potential in the treatment of different painful or inflammatory conditions.

KEY WORDS: riboflavin, inflammation, pain, nociception, edema, fever, cell migration, fibrovascular tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas químicas da riboflavina, do FMN e do FAD.....	21
Figura 2	Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	32
Figura 3	Avaliação da alodínia mecânica por meio do uso de filamento de nylon.....	33
Figura 4	Avaliação do edema de pata por meio do uso do plestismômetro.....	34
Figura 5	Efeito induzido pela riboflavina sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante.....	39
Figura 6	Efeito induzido pela riboflavina sobre o comportamento exploratório dos animais no modelo do campo aberto.....	39
Figura 7	Efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	40
Figura 8	Efeito induzido pela riboflavina sobre o tempo de permanência dos animais na placa quente.....	41
Figura 9	Efeito induzido pela riboflavina (-30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	42
Figura 10	Efeito induzido pela riboflavina (3 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	42
Figura 11	Efeito induzido pela riboflavina (0 e 2 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	43
Figura 12	Efeito induzido pelo sulfato de cádmio sobre a frequência de retirada de pata e sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	44
Figura 13	Efeito induzido pelo sulfato de cádmio sobre a atividade antinociceptiva da riboflavina no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina.....	45
Figura 14	Efeito induzido pela riboflavina sobre a alodínia mecânica induzida por PDD.....	45
Figura 15	Efeito induzido pela morfina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	46

Figura 16	Efeito induzido pela morfina, pela riboflavina (25 mg/kg) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	47
Figura 17	Efeito induzido pela morfina, pela riboflavina (10 mg/kg) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....	48
Figura 18	Efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	49
Figura 19	Efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata induzido por PDD.....	50
Figura 20	Efeito induzido pela riboflavina sobre a migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina.....	51
Figura 21	Efeito induzido pela riboflavina sobre a temperatura colônica e sobre a resposta febril induzida por LPS.....	52
Figura 22	Efeito induzido pela riboflavina (7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão.....	53
Figura 23	Efeito induzido pela riboflavina (2x dia; 7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios não-esteróides
ASC	Área sob a curva
Cg	Carragenina
COX	Ciclooxigenase
Dexa	Dexametasona
DL	Dose letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
5-HT	5-hidroxitriptamina
i.p.	Intraperitonal
i.pl.	Intraplantar
i.v.	Intravenosa
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Morf	Morfina
NO	Óxido nítrico
PDD	Forbol 12,13-didecanoato
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína quinase C
Rf	Riboflavina
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
STC	Síndrome do túnel do carpo
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
Veíc	Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVO.....	26
2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	26
2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	26
2.3	<i>Justificativa.....</i>	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	<i>Animais.....</i>	28
3.2	<i>Drogas.....</i>	28
3.3	<i>Preparo e administração das soluções e suspensões.....</i>	29
3.4	<i>Avaliação da atividade motora de camundongos no modelo da haste girante</i>	30
3.5	<i>Avaliação da atividade exploratória de camundongos no modelo do campo aberto.....</i>	31
3.6	<i>Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos.....</i>	31
3.7	<i>Avaliação da resposta nociceptiva de camundongos no modelo da placa quente.....</i>	32
3.8	<i>Avaliação da alodínia mecânica em ratos.....</i>	33
3.9	<i>Avaliação do edema de pata em ratos.....</i>	34
3.10	<i>Avaliação da migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina em ratos.....</i>	35
3.11	<i>Avaliação da resposta febril induzida por LPS em ratos.....</i>	35
3.12	<i>Avaliação da formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão em camundongos.....</i>	36
3.13	<i>Análise estatística.....</i>	36
3.14	<i>Protocolos experimentais.....</i>	37

4	RESULTADOS.....	39
4.1	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a atividade motora de camundongos.....</i>	39
4.2	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta nociceptiva em diferentes modelos experimentais.....</i>	40
4.3	<i>Avaliação da interação entre a riboflavina e a morfina no modelo da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....</i>	46
4.4	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata em ratos.....</i>	49
4.5	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina em ratos.....</i>	51
4.6	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta febril induzida por LPS em ratos.....</i>	52
4.7	<i>Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a formação de tecido fibrovascular induzido por implante s.c. de disco de algodão em camundongos.....</i>	53
4.8	<i>Resumo dos resultados.....</i>	55
5	DISCUSSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Uma vez que a dor associada a diferentes condições patológicas representa o sintoma que mais causa sofrimento aos pacientes, diferentes abordagens terapêuticas têm sido usadas com o objetivo de atenuá-la. Uma das abordagens mais comuns é a farmacoterapia. Entre as diferentes classes farmacológicas ou grupos terapêuticos que têm sido usados com o objetivo de aliviar a dor, podem ser mencionados os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), os analgésicos opióides, os agonistas α_2 -adrenérgicos, os antiepilépticos, os antidepressivos e, mais recentemente, as vitaminas do complexo B.

Os AINEs formam um grupo de diferentes fármacos que possuem atividades analgésica, antiedema e antipirética. Essas atividades dos AINEs estão relacionadas, principalmente, à inibição da síntese de importantes mediadores inflamatórios, especialmente as prostaglandinas (PGs) (VANE, 1971). As PGs sensibilizam nociceptores e contribuem, assim, para o desenvolvimento de dor, alodínia e hiperalgesia (FERREIRA *et al.*, 1978). Após a lesão tecidual, há aumento da transcrição do gene da ciclooxigenase 2 (COX-2) e a produção de eicosanóides no sítio inflamatório se eleva rapidamente (SEIBERT *et al.*, 1994). Além disso, já foi demonstrado que ocorre aumento da síntese de PGs no sistema nervoso central (SNC) após lesão tecidual (YANG *et al.*, 1996), bem como inibição da resposta nociceptiva após a injeção intratecal de inibidores da COX (DIRIG *et al.*, 1998). Esses resultados indicam que os eicosanóides também facilitam a resposta nociceptiva por meio de uma ação central. Também existem evidências de que a isoforma constitutiva da COX, COX-1, seja importante para o desenvolvimento dos sinais e sintomas associados à inflamação (WALLACE *et al.*, 1999; MAZARIO *et al.*, 2001). As PGs também estão associadas ao desenvolvimento de outros sinais e sintomas durante o processo inflamatório, como edema e febre. O desenvolvimento do edema inicia-se com a elevação do fluxo sanguíneo no local da lesão e aumento do calibre e da permeabilidade vascular, o que resulta no extravasamento de líquido e formação de edema. A febre, outro sinal inflamatório que causa desconforto aos pacientes, tem

importante papel na resposta imune e pode resultar da liberação de PGE₂ no hipotálamo estimulada por pirogênicos endógenos ou exógenos (COLLINS, 1999).

Entre os AINEs, existem os inibidores não-seletivos da COX, como diclofenaco, indometacina e ibuprofeno, e os inibidores seletivos da COX-2, como celecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe. Os AINEs inibem a conversão do ácido araquidônico em PGG₂ e PGH₂ pela COX. Essas PGs são substratos para outras enzimas que as convertem em PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} e tromboxano A₂ (TXA₂) (VANE, 1971). Além da inibição da COX, os AINEs, em concentrações mais elevadas, inibem a síntese de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (OSNES *et al.*, 1996), a interleucina-1β (IL-1β) (EGAN *et al.*, 1999) e a IL-6 (FIEBICH *et al.*, 1999). Também inibem a translocação do fator de transcrição nuclear κB, o qual está envolvido na síntese de vários mediadores inflamatórios e no recrutamento de células para o local da lesão (WEBER *et al.*, 1995). Uma vez que as PGs podem estimular a produção de óxido nítrico (NO), o tratamento com AINEs também pode inibir, de forma indireta, a síntese desse mediador no sítio inflamatório (SÁNCHEZ de MIGUEL *et al.*, 1999).

O uso dos AINEs é limitado pela possibilidade de ocorrência de várias reações adversas. Muitas dessas reações estão relacionadas à inibição da síntese de PGs que também possuem funções fisiológicas. A inibição da síntese da PGE₂ e da PGI₂ pode resultar em lesão das mucosas gástrica e intestinal. Essas PGs induzem efeito protetor nesses locais pois reduzem a secreção ácida gástrica e aumentam a secreção de muco citoprotetor, entre outras ações (KONTUREK *et al.*, 1981; ROBERTS & MORROW, 2001). Por sua vez, a inibição da síntese de TXA₂ aumenta o tempo de sangramento da microvasculatura, uma vez que esse eicosanóide induz agregação plaquetária e vasoconstrição (ROBERTS & MORROW, 2001). Foi sugerido que os inibidores seletivos da COX-2, desenvolvidos recentemente, não induziriam as mesmas reações adversas observadas durante o tratamento com os inibidores não seletivos da COX, uma vez que a isoforma 2 da enzima estaria presente, principalmente, em processos inflamatórios e não possuiria funções fisiológicas

importantes (SEIBERT *et al.*, 1994). Entretanto, foi demonstrada a expressão constitutiva do gene da enzima COX-2 em diferentes tecidos. Na mucosa estomacal, parte da síntese de PGs, que têm função protetora nesse tecido, é dependente da COX-2 (ZIMMERMANN *et al.*, 1998). No endotélio, a COX-2 também é responsável pela síntese de PGI₂ em condições fisiológicas (McADAM *et al.*, 1999). Além disso, um estudo, no qual foram usados animais deficientes para o gene da COX-2, demonstrou a importância dessa enzima para a manutenção da perfusão renal adequada (MORHAM *et al.*, 1995). Com a comprovação de que o uso prolongado de inibidores seletivos da COX-2 aumenta o risco de ocorrência de doenças tromboembólicas (MUKHERJEE *et al.*, 2001), os medicamentos Vioxx® (rofecoxibe) e Bextra® (valdecoxibe) foram retirados do mercado em 2004 e 2005, respectivamente, pelas indústrias farmacêuticas que os produziam.

Entre os fármacos usados para o alívio da dor, mas que não são usados como antipiréticos ou para redução do edema inflamatório, os analgésicos opióides são os mais conhecidos. Esses fármacos interagem principalmente com receptores opióides μ , κ e δ , que estão acoplados à proteína G_i ou G_o. Quando esses receptores são ativados por diversos agonistas, há inibição da adenilato-ciclase e redução do conteúdo intracelular de AMP cíclico. Além disso, a ativação de receptores opióides reduz o influxo de cálcio e aumenta o efluxo de potássio, o que reduz a excitabilidade de neurônios envolvidos na transmissão da informação nociceptiva (SATO & MINAMI, 1995; GUTSTEIN & AKIL, 2006). Apesar da sua utilidade como analgésicos, os opióides podem induzir graves reações adversas. Entre elas, podem ser citadas depressão respiratória e constipação. O uso prolongado dos analgésicos opióides também está associado ao desenvolvimento de tolerância, o que torna necessário o uso de doses elevadas para obtenção do efeito analgésico e aumenta o risco de ocorrência de reações adversas. Além disso, esses fármacos, em geral, podem induzir alterações neuroquímicas e comportamentais que contribuem para o uso abusivo e dependência (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

Apesar do amplo uso dos AINEs e analgésicos opióides, a sua eficácia analgésica é reduzida em muitas condições dolorosas. Assim, alguns fármacos originalmente aprovados para o tratamento de outras doenças têm sido usados para o alívio da dor associada ou não a processos inflamatórios (BROWER, 2000). A base racional para o uso desses fármacos está no conhecimento dos seus alvos moleculares e das estruturas e sistemas envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva.

Sabe-se, por exemplo, que a inibição de canais de sódio em nociceptores está relacionada ao efeito induzido por drogas com atividade anestésica local, como a lidocaína (WANG *et al.*, 1995). Agonistas α_2 -adrenérgicos, originalmente empregados como anti-hipertensivos, são usados em procedimentos pré-anestésicos por induzirem efeitos ansiolítico, sedativo e analgésico, possibilitando a redução da dose de anestésicos (KHAN *et al.*, 1999). Clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico, reduz a liberação de glutamato induzida por capsaicina, um efeito que é inibido por antagonistas de receptores α_2 -adrenérgicos (LI & EISENACH, 2001). Antiepilépticos e antidepressivos também têm sido usados como analgésicos. Esses fármacos são indicados, principalmente, para alívio de dores neuropáticas, ou seja, aquelas resultantes de lesões do sistema nervoso ou de processamento anormal da informação nociceptiva no SNC, muitas vezes associadas a condições como câncer, diabetes, uso de antineoplásicos, etc. Estudos clínicos demonstraram a eficácia analgésica da carbamazepina (TANELIAN & BROSE, 1991), fenitoína (McCLEANE, 1999), lamotrigina (SIMPSON *et al.*, 2000), gabapentina (ROWBOTHAM *et al.*, 1998), pregabalina (LESSER *et al.*, 2004) e topiramato (RASKIN *et al.*, 2004). A redução da atividade neuronal por essas drogas é mediada, aparentemente, pelo bloqueio de canais de sódio, mas outros efeitos devem contribuir para o alívio da dor (JENSEN, 2002). Em relação aos antidepressivos, a atividade daqueles que inibem a recaptação da 5-hidroxitriptamina (5-HT) e norepinefrina (imipramina, amitriptilina, clomipramina) é semelhante àquela dos inibidores relativamente seletivos da recaptação da norepinefrina (desipramina, nortriptilina, maprotilina). Por sua vez, inibidores seletivos da recaptação da 5-HT (paroxetina e citalopram) são úteis no

alívio da dor associada à neuropatia diabética e melhor tolerados que os antidepressivos tricíclicos (SINDRUP & JENSEN, 2000).

O uso de outra classe de fármacos, as vitaminas do complexo B, no alívio de diferentes condições dolorosas também tem sido investigado. Apesar do principal uso terapêutico dessas vitaminas ser a correção de deficiências e, conseqüentemente, a eliminação dos sinais e sintomas provocados pela ingestão insuficiente desses nutrientes, existem várias evidências que dão suporte à sua potencial atividade analgésica. Entretanto, os mecanismos por meio dos quais essa atividade se estabelece não são compreendidos.

As vitaminas do complexo B são substâncias orgânicas que exercem importantes funções em diferentes processos metabólicos. Esse complexo é formado por onze vitaminas: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, cianocobalamina, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, inositol, colina e ácido para-aminobenzóico. Apesar de possuírem estruturas químicas distintas e apresentarem atividades biológicas diversas, essas vitaminas foram agrupadas em um complexo por terem sido, inicialmente, isoladas das mesmas fontes, principalmente fígado e leveduras. Além disso, o metabolismo dessas substâncias está interligado. Por exemplo, o metabolismo da piridoxina depende de coenzima derivada da riboflavina (McCORMICK, 2003), o que poderia explicar a deficiência de mais de uma vitamina do complexo B em um mesmo paciente. Por serem substâncias hidrossolúveis, as vitaminas do complexo B não são armazenadas em quantidades consideráveis no organismo e, portanto, devem ser ingeridas diariamente (MARCUS & COULSTON, 2001).

Os sinais e sintomas associados à deficiência de vitaminas do complexo B podem variar dependendo de qual vitamina está insuficiente e do grau de privação. Nos pacientes que apresentam deficiência de riboflavina, nicotinamida, piridoxina ou biotina, podem ser observadas dermatites em diferentes regiões do corpo como extremidades, face e couro cabeludo. Em casos de deficiência grave ou crônica de

vitaminas do complexo B, podem ocorrer alterações morfológicas e funcionais no sistema nervoso (MARCUS & COULSTON, 2001).

Em 1916, McCollum e Kennedy isolaram do farelo de arroz um composto denominado vitamina B, capaz de curar o beribéri, uma síndrome apresentada por pacientes cuja base alimentar era o arroz polido. Estudos mais detalhados sobre a vitamina B demonstraram que a atividade antiberibéri encontra-se na fração termolábil do extrato do farelo de arroz, que foi denominada vitamina B₁ ou tiamina (GYÖRGY, 1967). O beribéri inclui uma série de sinais e sintomas que afetam diferentes sistemas, entre eles o cardiovascular, podendo resultar em insuficiência cardíaca nos casos mais graves. Os pacientes também relatam fadiga muscular, mialgia e parestesia, principalmente em membros inferiores. Avaliações eletrofisiológicas demonstraram redução da velocidade de condução de potenciais de ação em nervos e músculos desses membros e a biópsia de nervos de indivíduos com beribéri demonstrou a perda de fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas (KOIKE *et al.*, 2004).

A deficiência grave da tiamina também pode provocar uma alteração psiquiátrica conhecida como síndrome de Wernicke-Korsakoff. Essa síndrome é caracterizada por uma condição grave e aguda, a encefalopatia de Wernicke, cujos sinais e sintomas são confusão mental, distúrbios oculomotores e ataxia. O quadro clínico pode evoluir para a psicose de Korsakoff, uma alteração neuropsiquiátrica crônica caracterizada por amnésia (MARTIN *et al.*, 2003). Parte das manifestações dessa síndrome está associada ao comprometimento do metabolismo cerebral da glicose que é dependente da tiamina (MURATA *et al.*, 1999). A coenzima derivada dessa vitamina, tiamina-pirofosfato, é co-fator para as enzimas α -cetoglutarato desidrogenase, transquetolase e piruvato desidrogenase. A redução da atividade dessas enzimas, resultante da deficiência da tiamina, compromete não só o metabolismo energético, mas também a síntese de ácidos nucleicos, neurotransmissores (acetilcolina, aspartato e ácido gama-aminobutírico - GABA), proteínas e mielina (MARTIN *et al.*, 2003).

Outra vitamina do complexo B, a piridoxina (vitamina B₆) foi isolada da fração termoestável do extrato do farelo de arroz. Ela possui dois derivados ativos: piridoxal e piridoxamina (GYÖRGY, 1967). Essas substâncias dão origem à coenzima piridoxal-fosfato que está envolvida no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. A deficiência da piridoxina provoca diversos sinais e sintomas. Pode surgir dermatite seborréica na região dos olhos, nariz e lábios, além de glossite e estomatite (MUELLER & VILTER, 1950). Além disso, o funcionamento do sistema nervoso pode ser afetado pela deficiência de piridoxina. Em animais com deficiência dessa vitamina, observa-se redução da velocidade de condução de nervos e perda de mielina (CLAUS *et al.*, 1984), bem como diminuição da reatividade a estímulos sonoros e táteis (SCHAEFFER, 1987). A piridoxina também é essencial durante o desenvolvimento do SNC. Animais submetidos à deficiência dessa vitamina durante os períodos de gestação ou lactação apresentam redução do número de neurônios no SNC, do número de projeções formadoras da árvore dendrítica e do número de sinapses, resultando em menor número de conexões entre neurônios (KIRKSEY *et al.*, 1990). Além das modificações estruturais, a deficiência da piridoxina induz alterações bioquímicas no SNC. Animais com deficiência dessa vitamina apresentam menor concentração de 5-HT e redução da atividade da haloenzima ácido glutâmico-desidrogenase, responsável pela síntese de GABA, em diferentes regiões do cérebro (DAKSHINAMURTI *et al.*, 1987).

Também existem outras evidências que demonstram a importância da piridoxina para o funcionamento do SNC. Uma delas é um tipo raro de crises convulsivas recorrentes, controladas pela piridoxina, mas não por antiepilépticos convencionais. A alteração bioquímica responsável por esse tipo de crise convulsiva não foi identificada (BAXTER, 2003). Enquanto um estudo demonstrou redução da síntese de GABA nos indivíduos afetados (GOSPE *et al.*, 1994), outro não detectou tal alteração (GOTO *et al.*, 2001). Apesar disso, o diagnóstico e o tratamento precoce com a piridoxina são importantes, pois evitam danos neurológicos.

Outra vitamina do complexo B com importantes funções biológicas é a cianocobalamina (vitamina B₁₂), uma substância que participa do metabolismo do aminoácido metionina e do ácido fólico e, também, da síntese de ácidos nucléicos. Essa última função faz com que a deficiência da cianocobalamina prejudique a mitose e, portanto, afete de forma marcante os tecidos nos quais há alta taxa de renovação celular, como o tecido hematopoiético. Por esse motivo, a anemia megaloblástica é um dos sinais iniciais da deficiência da cianocobalamina (HILLMAN, 2001). A deficiência dessa vitamina também afeta o SNC, o que pode resultar em parestesia, perda sensorial, ataxia, demência e desordens psiquiátricas (CARETHERS, 1988). Em alguns casos, esses sinais e sintomas não estão associados a alterações hematológicas evidentes (LINDENBAUM *et al.*, 1988).

De forma semelhante à tiamina, à piridoxina e à cianocobalamina, outro componente do complexo B, a riboflavina ou vitamina B₂ (FIG 1A), também apresenta funções biológicas bem conhecidas. Essa vitamina foi isolada, inicialmente, de ovos, fígado e de leite e derivados e também é encontrada em vegetais verdes e cereais. Entretanto, por ser fotossensível, parte da riboflavina é perdida durante o processamento e o armazenamento dos alimentos, que devem ser protegidos da luz. Grande parte da riboflavina presente nos alimentos encontra-se ligada às proteínas na forma das coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (FIG 1 B e C). Essas moléculas são liberadas no meio ácido estomacal e são desfosforiladas no intestino pela ação de pirofosfatases e fosfatases inespecíficas. A riboflavina livre é absorvida por transporte ativo pelo enterócito em um processo que envolve fosforilação-desfosforilação e, após ser transportada para o plasma, liga-se, em parte, à albumina e a outras proteínas, como certas imunoglobulinas (KASAI *et al.*, 1990; POWERS, 2003).

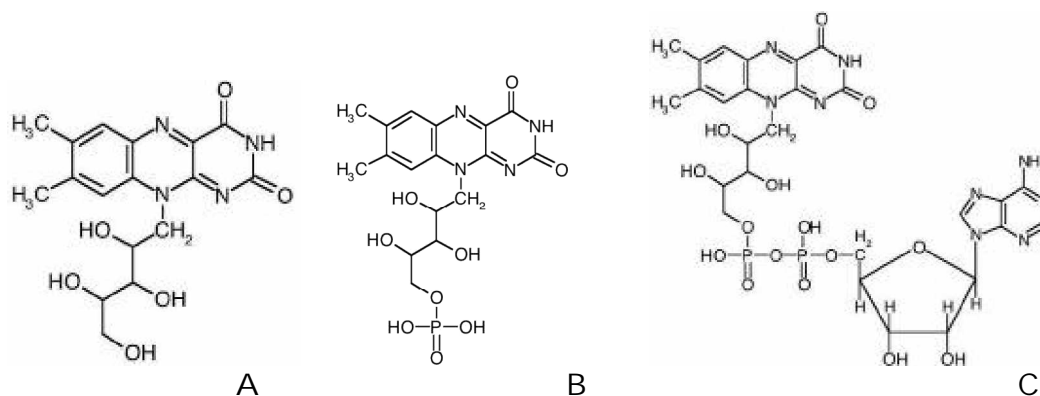


Figura 1 – Estruturas químicas da riboflavina (A), do FMN (B) e do FAD (C).

Nas mais diversas células, a riboflavina é metabolizada e dá origem às coenzimas FMN e FAD, que participam das reações de oxi-redução, do metabolismo de ácidos graxos, da cadeia respiratória e do metabolismo do ácido fólico, da cianocobalamina e da piridoxina (POWERS, 2003). A primeira etapa da conversão dessa vitamina é catalisada pela enzima flavoquinase, com a formação de FMN. A segunda fosforilação é realizada pela enzima FAD-sintase (McCORMICK, 2003). O metabolismo da riboflavina é regulado por hormônios tireoideanos (tiroxina e triiodotironina) e hormônios do eixo hipófise-adrenais (hormônio adrenocorticotrópico e aldosterona), que aumentam a síntese de FMN e FAD (RIVLIN, 1979).

A deficiência da riboflavina pode resultar, entre outros fatores, da ingestão inadequada ou do alcoolismo e, em geral, está associada à deficiência de outras vitaminas. Além disso, alguns fármacos podem inibir o metabolismo da riboflavina, aumentar a sua eliminação e provocar a sua deficiência. Entre esses estão a clorpromazina, os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina e imipramina) (PINTO *et al.*, 1981) e o antineoplásico doxorrubicina (PINTO *et al.*, 1986). Alguns metais pesados, entre os quais cádmio, cobre e mercúrio, também inibem a conversão da riboflavina em FMN pela flavoquinase (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997). A deficiência da riboflavina também pode ser induzida pela administração de análogos dessa substância, como a galactoflavina (EMERSON *et al.*, 1945). Os principais sinais

e sintomas da deficiência da riboflavina são queilose, glossite, dermatite seborréica e distúrbios oculares, incluindo prurido, sensibilidade à luz e vascularização da córnea. Também podem ocorrer anemia normocítica e normocrômica e neuropatia (JORTNER *et al.*, 1987; MARCUS & COULSTON, 2001; POWERS, 2003).

Além da participação em reações do metabolismo de macronutrientes, a riboflavina apresenta atividade antioxidante que se estabelece por diferentes mecanismos. O principal deles inicia-se com a conversão da riboflavina na coenzima FAD que faz parte da enzima glutatona redutase, responsável pela redução da glutatona. Essa, por sua vez, é o co-fator da glutatona peroxidase, importante enzima antioxidante. A atividade antioxidante de outras enzimas, como NADPH citocromo P450-redutase, também é dependente da riboflavina. A redução da atividade dessas enzimas prejudica a proteção do organismo contra espécies reativas do oxigênio. Hirano *et al.* (1983) demonstraram que ratos alimentados com dieta deficiente em riboflavina, durante oito semanas, apresentam elevação das concentrações plasmáticas de lipoperóxidos e redução da atividade das enzimas hepáticas glutatona redutase e NADPH citocromo P450-redutase. Além disso, a atividade da enzima glutatona peroxidase do cristalino também é reduzida em animais com deficiência da riboflavina, uma alteração que pode estar associada ao desenvolvimento de catarata causada pelo acúmulo local de radicais livres. Em modelos de lesão oxidativa de pulmão, a riboflavina induz efeito protetor caracterizado por redução da hemorragia e do edema. Possivelmente, a riboflavina induz seu efeito por meio da inativação de espécies reativas de oxigênio que parecem estar envolvidas nas lesões vasculares provocadas pelo estresse oxidativo (SEEKAMP *et al.*, 1999).

O efeito benéfico induzido por altas doses da riboflavina em pacientes com doença de Parkinson (COIMBRA & JUNQUEIRA, 2003) também parece estar associado à atividade antioxidante dessa vitamina. Nesses pacientes, é detectado certo grau de deficiência da riboflavina, o que pode contribuir para a menor conversão da glutatona em seu estado reduzido e para a incapacidade de o organismo eliminar, de forma eficiente, os metabólitos prejudiciais para as células do SNC.

As coenzimas FAD e FMN, das quais a riboflavina é precursora, estão presentes em diferentes enzimas mitocondriais que participam da respiração celular. Esses cofatores atuam, por exemplo, na transferência de elétrons na cadeia respiratória. Disfunções mitocondriais no SNC podem levar ao desenvolvimento de síndromes metabólicas que, entre outros sinais e sintomas, provocam dor nos pacientes. O tratamento desses pacientes com riboflavina, tiamina e citocromo c (TANAKA *et al.*, 1997a; TANAKA *et al.*, 1997b) ou riboflavina e idebenona, um análogo sintético da coenzima Q₁₀ (NAPOLITANO *et al.*, 2000), contribui para a recuperação do quadro clínico e do metabolismo energético, demonstrando a importância desses processos metabólicos para o funcionamento adequado do SNC.

A enxaqueca, uma condição dolorosa menos rara, também pode ser aliviada pelo tratamento com a riboflavina. Embora existam diferentes causas da enxaqueca, em alguns pacientes é detectada uma disfunção mitocondrial no SNC, o que pode levar à ocorrência das crises (MONTAGNA *et al.*, 1994). Estudos clínicos demonstraram que altas doses da riboflavina induzem efeito profilático, reduzindo a frequência e a duração das crises (SCHOENEN *et al.*, 1998; BOHENKE *et al.*, 2004). O uso de analgésicos convencionais durante as crises também é reduzido nos pacientes tratados com a riboflavina (BOHENKE *et al.*, 2004). A vantagem do tratamento com essa vitamina é a baixa incidência de reações adversas (SCHOENEN *et al.*, 1998) quando comparada com aquela associada a outros tratamentos profiláticos, como aqueles em que são usados antagonistas de receptores β -adrenérgicos, que fornecem resultados semelhantes (SÁNDOR *et al.*, 2000).

Outra condição dolorosa que parece estar associada à deficiência da riboflavina e da piridoxina, a síndrome do túnel do carpo (STC), é caracterizada pela perda de força das mãos, parestesia, perda de sensibilidade e dor que pode se estender do punho ao ombro. A STC pode ter diferentes causas, entre as quais a compressão do nervo mediano. Ellis *et al.* (1982) detectaram deficiência da piridoxina em pacientes que desenvolveram essa síndrome, sendo que os sintomas associados foram aliviados pela correção da deficiência. Por sua vez, Folkers *et al.* (1984) descreveram um caso

clínico no qual a STC estava associada à deficiência da piridoxina e, também, da riboflavina. O tratamento desse paciente com a riboflavina e a piridoxina reduziu os sinais e sintomas de forma rápida e eficaz e eliminou a necessidade de intervenção cirúrgica. Um estudo clínico demonstrou que a piridoxina não alterou, de forma significativa, os parâmetros eletrofisiológicos avaliados em pacientes com STC. Entretanto, foi observado, por meio do uso de escalas visuais para mensuração de dor, que o tratamento com a piridoxina induziu analgesia (BERNSTEIN & DINESEN, 1993). Porém, por se tratar de um estudo aberto, não controlado por placebo e com um pequeno número de pacientes, não foi possível definir se a piridoxina é realmente útil para o tratamento da STC. Goodyear-Smith & Arroll (2004), ao analisar vários estudos que avaliaram a eficácia da piridoxina no tratamento dessa condição dolorosa, concluíram que não há evidência consistente da sua utilidade.

Apesar das evidências que sugerem a utilidade das vitaminas do complexo B no tratamento de algumas condições dolorosas, poucos estudos foram realizados em animais experimentais com o objetivo de caracterizar o efeito antinociceptivo induzido por essas vitaminas. Alguns estudos demonstraram que associações de tiamina/piridoxina /cianocobalamina induzem efeito antinociceptivo nos modelos de placa quente, contorções abdominais induzidas por ácido acético e benzoquinona e de resposta nociceptiva induzida por formaldeído (BARTOSZYK & WILD, 1990; ZIMMERMANN *et al.*, 1990; FRANÇA *et al.*, 2001), bem como em modelos experimentais de neuropatia (WANG *et al.*, 2005). Além disso, as associações de vitaminas do complexo B aumentam o efeito antinociceptivo induzido por AINEs (BARTOSZYK & WILD, 1989; ZIMMERMANN *et al.*, 1990; REYES-GARCÍA *et al.*, 1999). Esses estudos indicam que o uso concomitante de vitaminas do complexo B e AINEs poderia permitir a redução das doses desses antiinflamatórios e, conseqüentemente, da incidência de reações adversas.

Estudos conduzidos em animais experimentais, nos quais se avaliou o efeito induzido pela riboflavina, são ainda mais raros. França *et al.* (2001) demonstraram que o efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina no modelo de formaldeído é

observado após tratamento agudo, enquanto a tiamina, a piridoxina ou a associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina só induzem efeito antinociceptivo após tratamento prolongado com doses mais elevadas. No modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina também é marcante e observado após o tratamento com doses muito inferiores às das demais vitaminas. A riboflavina também reduz a hiperalgesia térmica e o edema de pata induzidos por carragenina em ratos, assim como a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído (GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004). O efeito antiedema induzido por essa vitamina também foi demonstrado no modelo de edema de pata induzido por óleo de oliva em camundongos (VERDRENGH & TARKOWSKI, 2005).

Estudos recentes demonstraram que a administração intravenosa da riboflavina reduz a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6, interferon (IFN) γ , proteína quimiotática de monócito 1, proteína inflamatória de macrófago 2 e do NO induzida pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* em camundongos. Além disso, aumenta a sobrevivência dos animais tratados com LPS em até 95% (TOYOSAWA *et al.*, 2004; KODAMA *et al.*, 2005).

Em síntese, os resultados de estudos clínicos e experimentais sugerem que a riboflavina pode ser um fármaco útil no tratamento de condições dolorosas ou processos inflamatórios relacionados ou não a sua deficiência. Além disso, essa vitamina é uma droga aprovada para uso clínico e induz raras reações adversas em adultos e crianças (TANAKA *et al.*, 1997a; SCHOENEN *et al.*, 1998; BOEHNKE *et al.*, 2004). Portanto, a caracterização do efeito induzido pela riboflavina em diferentes modelos de nocicepção e inflamação seria útil para a determinação da possível utilidade desse fármaco no tratamento de diferentes condições patológicas que não estão necessariamente associadas a sua deficiência.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito induzido pela riboflavina em diferentes modelos experimentais de nocicepção e inflamação, bem como investigar a possível interação entre essa vitamina e a morfina em relação ao efeito antinociceptivo.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o efeito induzido pela riboflavina em diferentes modelos de nocicepção.
2. Investigar o efeito induzido pelo cádmio sobre a atividade antinociceptiva da riboflavina.
3. Avaliar a interação entre a riboflavina e a morfina em um modelo de nocicepção.
4. Caracterizar o efeito induzido pela riboflavina no modelo de edema de pata.
5. Caracterizar o efeito induzido pela riboflavina sobre a migração celular na cavidade peritoneal.
6. Caracterizar o efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta febril induzida por LPS.
7. Caracterizar o efeito induzido pela riboflavina sobre a formação de tecido fibrovascular.

2.3 Justificativa

O uso das vitaminas do complexo B para o alívio de condições dolorosas tem sido investigado como alternativa ao uso de outros fármacos que apresentam atividade analgésica ou em associação a esses, a fim de se estabelecer um tratamento adequado

e com menor incidência de reações adversas. As vitaminas mais estudadas têm sido a tiamina, a piridoxina e a cianocobalamina.

Estudos recentes demonstraram o efeito antinociceptivo e antiedema induzidos pela riboflavina, outra vitamina do complexo B, em animais experimentais. Em função do número reduzido de avaliações dos efeitos induzidos pela riboflavina e por essa ser uma droga aprovada para uso clínico, a condução de um estudo que investigue de forma mais ampla o seu efeito sobre a resposta nociceptiva e a inflamação induzidas por diferentes estímulos, bem como a possível interação entre essa vitamina e analgésicos convencionais, é importante para estabelecer seu potencial uso clínico no alívio de diferentes condições dolorosas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram usados ratos Wistar fêmeas (200 - 250 g) e camundongos Swiss fêmeas (25 - 30 g). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em uma sala com temperatura controlada (27 ± 1 °C), correspondente à zona de termoneutralidade de ratos e camundongos (GORDON, 1990). Os animais foram ambientados na sala de experimento por pelo menos três dias antes da realização dos protocolos. Durante os experimentos, os animais foram manipulados cuidadosamente, de forma a resultar no menor estresse comportamental possível. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação em animais (ZIMMERMANN, 1983) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo 114/2005).

3.2 Drogas

- Carragenina λ (Sigma, USA) – Estímulo inflamatório.
- Cetamina 10% (Ketamina Agener[®], Agener-União, Brasil) – Anestésico.
- Formaldeído (Ecibra, Brasil) – Estímulo inflamatório.
- Forbol-12,13-didecanoato (PDD, Sigma, USA) – Ativador da proteína quinase C (PKC).
- 21-fosfato de dexametasona (Sigma, USA) – Antiinflamatório esteróide.
- Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma, USA) – Estímulo inflamatório.
- Riboflavina (Sigma, USA) – Vitamina do complexo B.
- Sulfato de cádmio 8/3 H₂O (Sigma, USA) – Inibidor da flavoquinase.
- Sulfato de morfina 5 H₂O (Cristália, Brasil) – Analgésico opióide.
- Xilazina 2% (Calmium[®], Agener-União, Brasil) – Coadjuvante de anestesia.

3.3 Preparo e administração das soluções e suspensões

A suspensão da riboflavina foi preparada em salina, imediatamente antes de cada administração. O volume de injeção foi 4 ml/kg em camundongos e 2 ml/kg em ratos. Nos protocolos para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a atividade motora e sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído e por calor (placa quente), essa vitamina foi administrada 30 min antes da avaliação comportamental. Duas administrações da riboflavina, uma imediatamente e outra 2 h após o estímulo inflamatório, foram realizadas na maioria dos protocolos para avaliação do efeito induzido por essa vitamina sobre a alodínia mecânica, o edema de pata, a migração celular e a resposta febril. Em protocolos preliminares para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a alodínia mecânica, essa vitamina foi administrada 30 min antes ou 3 h após a injeção do estímulo inflamatório. Nos protocolos para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a formação de tecido fibrovascular, essa vitamina foi administrada durante sete dias, com intervalos de 12 ou 24 h. A riboflavina foi administrada por via intraperitoneal (i.p.), com exceção do protocolo para avaliação do efeito induzido por essa vitamina sobre a migração celular, no qual a administração foi realizada por via subcutânea (s.c.).

A solução da morfina foi preparada em salina e administrada por via i.p., 30 min antes da injeção de formaldeído. O volume de injeção foi 4 ml/kg. Nos protocolos em que a morfina foi associada à riboflavina, esses dois fármacos foram administrados separadamente a fim de evitar possíveis interações físico-químicas entre as soluções.

A solução da dexametasona foi preparada em salina e administrada por via s.c., 1 h antes da injeção de carragenina. O volume de injeção foi 1 ml/kg.

A solução do sulfato de cádmio foi preparada em salina e administrada por via i.p., 24 h antes do tratamento com a riboflavina. O volume de injeção foi 1 ml/kg.

A solução de formaldeído foi preparada em salina na concentração de 0,92%, imediatamente antes do experimento. Foram injetados 20 μ l dessa solução por via s.c. na superfície dorsal da pata posterior direita dos animais.

Nos protocolos para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata, a suspensão de carragenina foi preparada em salina na concentração de 1%. Foram injetados 50 μ l (500 μ g de carragenina) dessa suspensão por via intraplantar (i.pl.) na pata posterior direita dos animais. No protocolo para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a migração celular, foi usada uma suspensão de carragenina 0,05%. Foi injetado 1 ml (500 μ g de carragenina) dessa suspensão por via i.p..

O PDD foi mantido em solução estoque (DMSO 100%) a -70 °C em tubetes contendo 1 μ g/ μ l. Imediatamente antes das injeções, essa droga foi diluída em salina, de forma a serem obtidas as concentrações adequadas para cada protocolo experimental: 0,1 μ g/50 μ l, no protocolo para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a alodínia mecânica, e 1 μ g/50 μ l, no protocolo para avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata. As concentrações finais de DMSO foram 0,2% e 2%, respectivamente. Durante o período da injeção, essa droga foi mantida em recipiente contendo gelo. Foram injetados 50 μ l da solução por via i.pl. na pata posterior direita dos animais.

O LPS foi mantido em solução estoque (salina) a -20 °C em tubetes contendo 1 μ g/ μ l. Imediatamente antes das injeções, essa droga foi diluída em salina estéril e apirogênica e administrada em uma das veias da cauda. A dose de LPS foi 50 μ g/kg e o volume de injeção foi 1 ml/kg.

3.4 Avaliação da atividade motora de camundongos no modelo da haste girante

A atividade motora foi avaliada na haste girante, de acordo com o procedimento proposto por Vaz *et al.* (1996), que representa uma modificação daquele

originalmente descrito por Dunham & Miya (1957). Um dia antes do experimento, os animais foram treinados no aparato. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal fossem semelhantes nos diferentes grupos experimentais. Durante o experimento, os animais foram colocados na haste girante a 12 rotações por minuto e o tempo de permanência no aparato foi determinado. O tempo de corte foi de 1 min.

3.5 Avaliação da atividade exploratória de camundongos no modelo do campo aberto

O comportamento exploratório de camundongos foi avaliado no campo aberto (RODRIGUES *et al.*, 1996). Um dia antes do experimento, os animais foram colocados, isoladamente, em uma caixa de polipropileno com 40x33x17 cm, dividida em nove retângulos, para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Durante o experimento, cada animal foi colocado no centro da caixa e o número de retângulos percorridos durante 1 min foi determinado.

3.6 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos

No dia do experimento, os animais foram colocados sob funis de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) (FIG 2) cerca de 30 min antes da administração de formaldeído, para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. O tempo durante o qual o animal apresentou o comportamento de lambida após a injeção s.c. de formaldeído foi cronometrado nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente. Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28 °C) é importante, pois a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em 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 lamber a pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva.

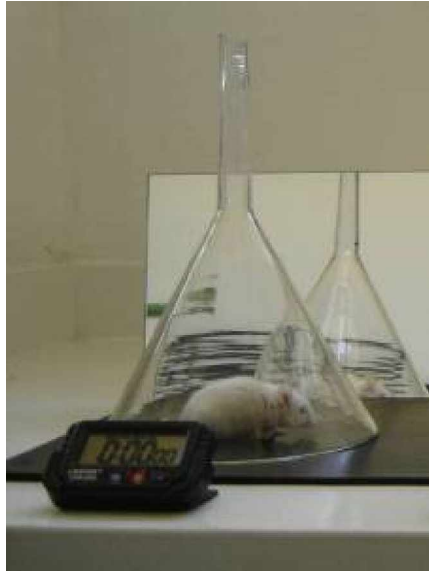


Figura 2 – Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

3.7 Avaliação da resposta nociceptiva de camundongos no modelo da placa quente

Esse modelo foi originalmente descrito por Woolfe & MacDonald (1944). Entretanto, no presente estudo, foi usada uma modificação do modelo original que foi descrita por Eddy & Leimbach (1953). Antes da realização do experimento, os camundongos foram colocados sobre a superfície não aquecida da placa para ambientação. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias de massa corporal dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica em contato direto com água aquecida a 55 ± 1 °C. O tempo para que os animais lambessem as patas ou saltassem, comportamentos indicativos de desconforto, foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. O tempo de corte foi de 30 s a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual.

3.8 Avaliação da alodínia mecânica em ratos

Nos dois dias anteriores ao experimento, os ratos foram colocados em compartimentos de acrílico (22x18x14 cm) dispostos sobre uma tela metálica. No dia do experimento, após nova ambientação, foi realizada a estimulação mecânica na pata posterior direita com um filamento de nylon (Estesiômetro, Sorri, Brasil), que, ao ser pressionado até que se curve (FIG 3), exerce uma força de 40 mN (SOUZA *et al.*, 2002). O toque com o filamento foi feito no centro da superfície plantar da pata e repetido dez vezes em cada animal tendo cada toque a duração aproximada de 1 s. O número de vezes que os animais retiraram a pata em resposta aos dez toques foi considerado como frequência basal de retirada da pata. Os animais com frequência basal de retirada superior a três foram excluídos do experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as médias das frequências basais dos diversos grupos fossem similares. A injeção i.pl. de carragenina ou PDD foi realizada com o auxílio de outro experimentador, sendo usada uma flanela para contenção do animal. A frequência de retirada da pata foi novamente determinada em diferentes momentos após a injeção do estímulo inflamatório. Os resultados foram expressos como frequência de retirada da pata aos dez toques realizados.

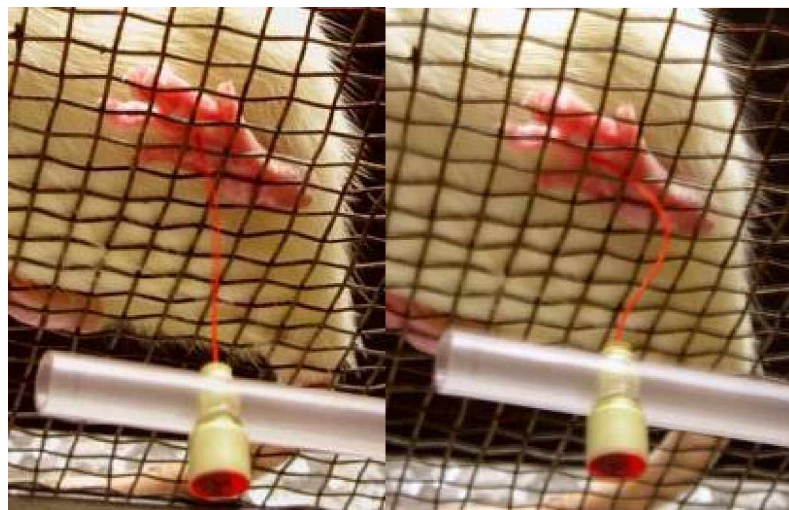


Figura 3 – Avaliação da alodínia mecânica por meio do uso de filamento de nylon.

3.9 Avaliação do edema de pata em ratos

Para a avaliação do volume de pata, foi usado um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (FIG 4). 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, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado. A divisão dos grupos para posterior realização dos tratamentos foi feita de forma que os volumes basais médios dos diversos grupos fossem similares. A injeção i.pl. de carragenina ou PDD foi realizada com o auxílio de outro experimentador, sendo usada uma flanela para contenção do animal. O volume de pata foi novamente determinado em diferentes momentos após a injeção do estímulo inflamatório. Os resultados foram expressos como variação do volume de pata em relação ao volume basal.

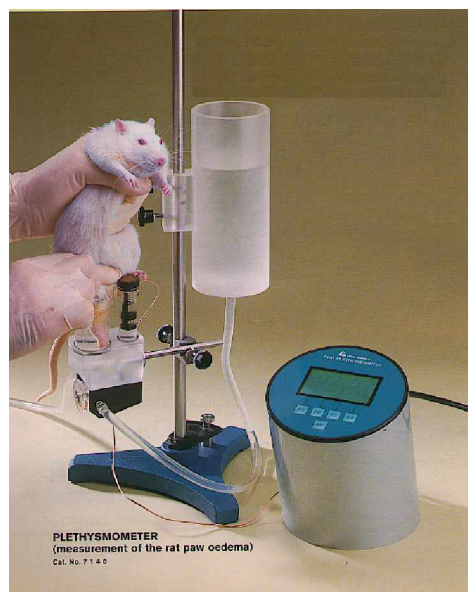


Figura 4 – Avaliação do edema de pata por meio do uso do pletismômetro.

3.10 Avaliação da migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina em ratos

A migração de células para a cavidade peritoneal de ratos foi induzida pela injeção i.p. de carragenina (CUNHA *et al.*, 1988). A eutanásia foi realizada 3 h após a injeção do estímulo inflamatório. Em seguida, foram injetados 10 ml de tampão fosfato contendo 1 mg/ml de EDTA dissódico (pH 7,4). O lavado peritoneal foi recolhido em tubos de plástico e centrifugado (1000 rpm, 3 min). O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspensionado em 2 ml de tampão fosfato e uma alíquota de 20 μ l foi adicionada a 400 μ l de solução de Turk. A suspensão foi homogeneizada e as células foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olympus WF10X). O número de células foi multiplicado por 50×10^3 e o resultado foi apresentado como número de células /ml de suspensão.

3.11 Avaliação da resposta febril induzida por LPS em ratos

A resposta febril foi avaliada de acordo com o método descrito por Coelho *et al.* (1992). No dia anterior ao experimento, os animais foram colocados em caixas de polipropileno (20x17x12 cm), em grupos de dois, para ambientação. Para a avaliação da temperatura colônica, foi usado um termômetro digital (Cole Parmer, Modelo 8403) acoplado a uma sonda (YSI, Modelo 700) que foi introduzida através do reto por 5 cm. A sonda, lubrificada com vaselina sólida, foi mantida por 20 s no animal não contido. No dia do experimento, os animais foram mantidos nas caixas de polipropileno e água foi fornecida *ad libitum*. A sonda foi introduzida nos animais quatro vezes em intervalos de uma hora, sendo que a média das duas últimas leituras foi considerada a temperatura colônica basal. Esse procedimento foi executado, pois, em experimentos preliminares, foi observado que o estresse comportamental induzido pela manipulação inicial dos animais provocava grandes variações na temperatura colônica. Essas variações tornavam-se gradualmente menores à medida que o procedimento era repetido. A divisão dos grupos para posterior realização dos tratamentos foi feita de forma que as temperaturas basais

médias dos diversos grupos fossem similares. A injeção intravenosa (i.v.) de LPS foi realizada com o auxílio de outro experimentador, sendo usada uma flanela para contenção do animal. A temperatura colônica foi novamente determinada em diferentes momentos após a injeção de LPS. Os resultados foram expressos como a variação da temperatura colônica ao longo do tempo e as áreas sob essas curvas (ASC).

3.12 Avaliação da formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão em camundongos

A formação do tecido fibrovascular foi induzida pelo implante s.c. de dois discos de algodão (10 mg) na região dorsal posterior dos animais (SWINGLE & SHIDEMAN, 1972). Os discos foram implantados em posições equidistantes, sob anestesia com xilazina (14 mg/kg, i.p.) e cetamina (70 mg/kg, i.p.). O tratamento com riboflavina foi iniciado no dia seguinte e mantido durante sete dias consecutivos. No 8º dia, foi feita a eutanásia dos animais e o tecido fibrovascular foi removido e seco a 37 °C por 24 horas. Em seguida, determinaram-se suas massas brutas em balança analítica, sendo a massa do tecido fibrovascular calculada pela diferença entre a massa seca inicial (10 mg) e a massa final.

3.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio do teste *t* de Student ou por meio da análise de variância simples, seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Adotou-se o nível de significância de 5%.

3.14 Protocolos experimentais

Parâmetro avaliado, estímulo e animal usado	Protocolo	Gráfico	Página
Atividade motora camundongo	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de permanência na haste girante	FIG 5	39
	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento exploratório no campo aberto	FIG 6	39
Nocicepção (placa quente) camundongo	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de permanência na placa quente	FIG 8	41
Nocicepção (formaldeído) camundongo	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre a resposta nociceptiva	FIG 7	40
	Efeito induzido pela morfina (1, 2, 4 ou mg/kg, i.p.) sobre a resposta nociceptiva	FIG 15	46
	Efeito induzido pela morfina (2, 4 ou 8 mg/kg, i.p.), pela riboflavina (25 mg/kg) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva	FIG 16	47
	Efeito induzido pela morfina (2 mg/kg, i.p.), pela riboflavina (10 mg/kg, i.p.) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva	FIG 17	48
Nocicepção (carragenina) rato	Efeito induzido pela riboflavina (25 ou 50 mg/kg, i.p., -30 min) sobre a alodínia mecânica	FIG 9	42
	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., 3 h) sobre a alodínia mecânica	FIG 10	42
	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., 0 e 2 h) sobre a alodínia mecânica	FIG 11	43
	Efeito induzido pelo sulfato de cádmio (0,2 ou 1 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica	FIG 12	44
	Efeito induzido pelo sulfato de cádmio (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva da riboflavina (50 mg/kg, i.p.) no modelo de alodínia mecânica	FIG 13	45
Nocicepção (PDD) rato	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre a alodínia mecânica	FIG 14	45
Edema (carragenina) rato	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre o edema de pata	FIG 18	49
Edema (PDD) rato	Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre o edema de pata	FIG 19	50

Migração celular (carragenina) rato	Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre migração celular na cavidade peritoneal	FIG 20	51
Temperatura colônica (LPS) rato	Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p.) sobre a resposta febril	FIG 21	52
Formação de tecido fibrovascular camundongo	Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg. dia; i.p.; 7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular	FIG 22	53
	Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg. 2 x dia; i.p.; 7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular	FIG 23	54

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a atividade motora de camundongos

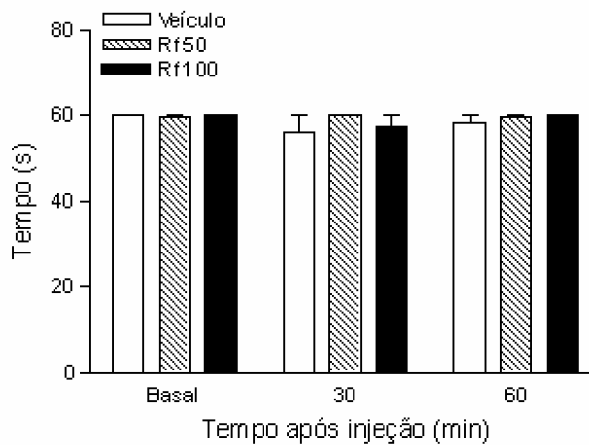


Fig. 5 – Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg, i.p., -30 min) sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante (12 rpm, 60 s) (n = 6).

A riboflavina (50 ou 100 mg/kg), administrada 30 min antes, não alterou o tempo de permanência dos camundongos na haste girante (FIG 5).

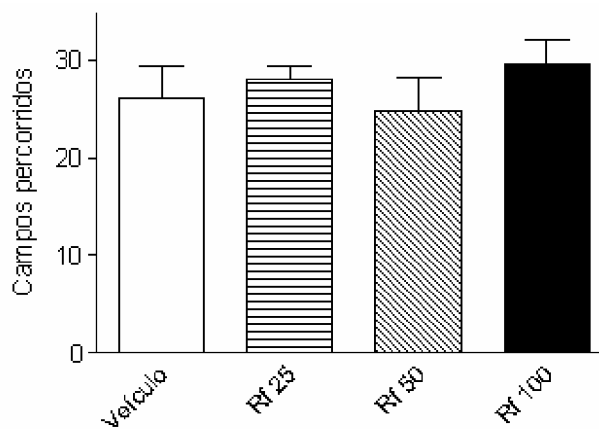


Fig. 6 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., -30 min) sobre o comportamento exploratório dos animais no modelo do campo aberto (n = 6).

Com o objetivo de investigar, de forma mais ampla, se a riboflavina altera o comportamento exploratório dos animais, foi usado o modelo do campo aberto. Esse comportamento não foi alterado pelo tratamento prévio (30 min) com a riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg) (FIG 6).

4.2 Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta nociceptiva em diferentes modelos experimentais

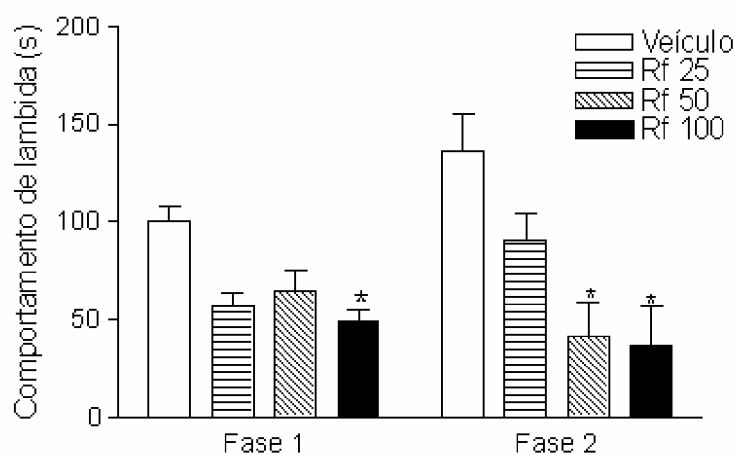


Fig. 7 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., -30 min) sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (0,92%; 20 μ l; s.c.) (n = 6). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

A riboflavina (50 ou 100 mg/kg), administrada 30 min antes, inibiu a segunda fase resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Entretanto, apenas a maior dose dessa vitamina inibiu a primeira fase dessa resposta (FIG 7).

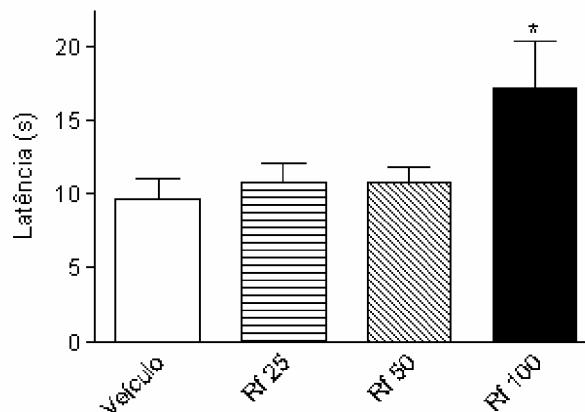


Fig. 8 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg, i.p., - 30 min) sobre o tempo de permanência dos animais na placa quente (n = 8). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

A riboflavina (100 mg/kg), administrada 30 min antes, aumentou a latência para a resposta nociceptiva no modelo da placa quente (FIG 8). Por outro lado, as doses de 25 ou 50 mg/kg não induziram efeito antinociceptivo nesse modelo.

Uma vez que a riboflavina inibiu a resposta nociceptiva de curta duração induzida por formaldeído, investigou-se, na seqüência, o efeito induzido por essa vitamina sobre uma resposta prolongada induzida por outro estímulo químico, a carragenina.

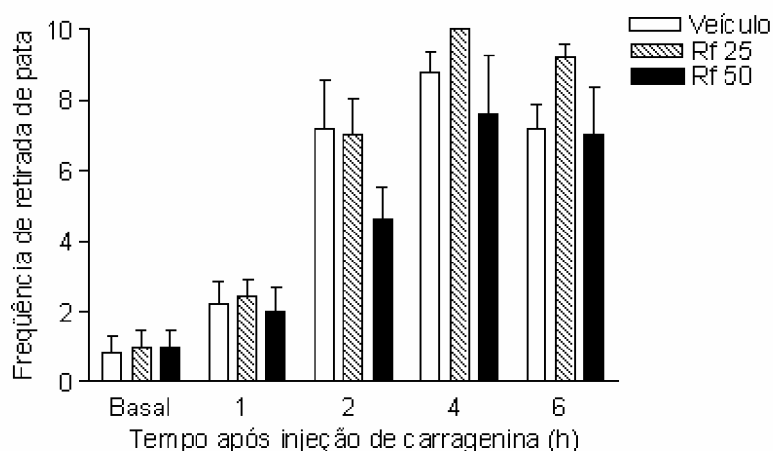


Fig. 9 – Efeito induzido pela riboflavina (25 ou 50 mg/kg; i.p.; -30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (1%, 50 μ l, i.pl.) (n = 5).

A riboflavina (25 ou 50 mg/kg), administrada 30 min antes da injeção de carragenina, não inibiu a alodínia mecânica induzida por esse estímulo inflamatório. Entretanto, foi observada uma tendência para inibição dessa resposta, com a dose de 50 mg/kg, 2 h após a injeção do estímulo inflamatório (FIG 9).

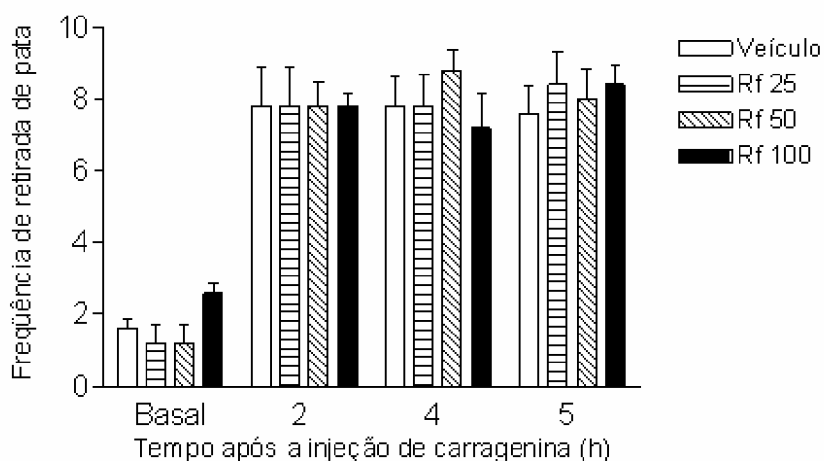


Fig. 10 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg; i.p.; 3 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (1%, 50 μ l, i.pl.) (n = 5).

A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg), administrada 3 h após a injeção de carragenina, não inibiu a alodínia mecânica (FIG 10). A avaliação da frequência de retirada de pata foi realizada 2, 4 e 5 h após a injeção do estímulo inflamatório. Na segunda hora, a resposta já havia atingido a intensidade máxima e a frequência de retirada se manteve constante até a última leitura, 5 h após a injeção de carragenina.

A riboflavina, administrada 30 min antes ou 3 h após a injeção de carragenina, não induziu efeito antinociceptivo, embora tenha sido observada tendência para inibição da alodínia mecânica na segunda hora após a injeção do estímulo inflamatório no primeiro protocolo. Portanto, foi avaliado se a administração de doses repetidas da riboflavina seria capaz de induzir efeito antinociceptivo.

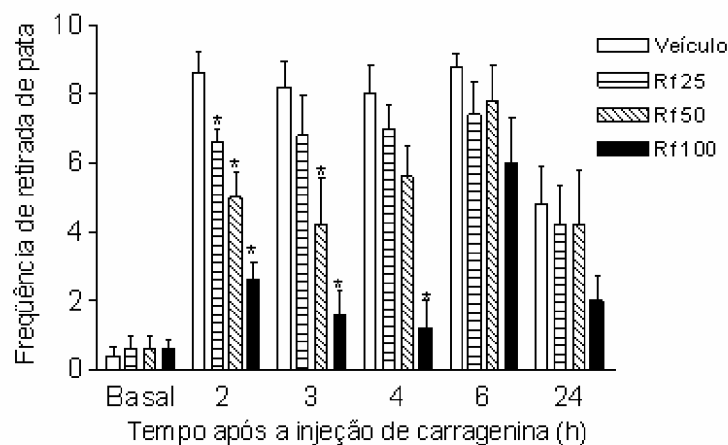


Fig. 11 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (1%, 50 μ l, i.pl.) (n = 5). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (p < 0,05).

A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg) foi administrada imediatamente e 2h após a injeção de carragenina. Com esse esquema de administração, foi observada inibição da resposta nociceptiva, sendo a duração desse efeito relacionada com a dose. Assim, as doses da riboflavina de 25, 50 ou 100 mg/kg reduziram a alodínia mecânica até a segunda, terceira e quarta horas, respectivamente. A partir da sexta hora da injeção

de carragenina, não foram mais observadas diferenças entre as respostas nociceptivas dos grupos tratados com veículo ou com uma das três doses da riboflavina (FIG 11).

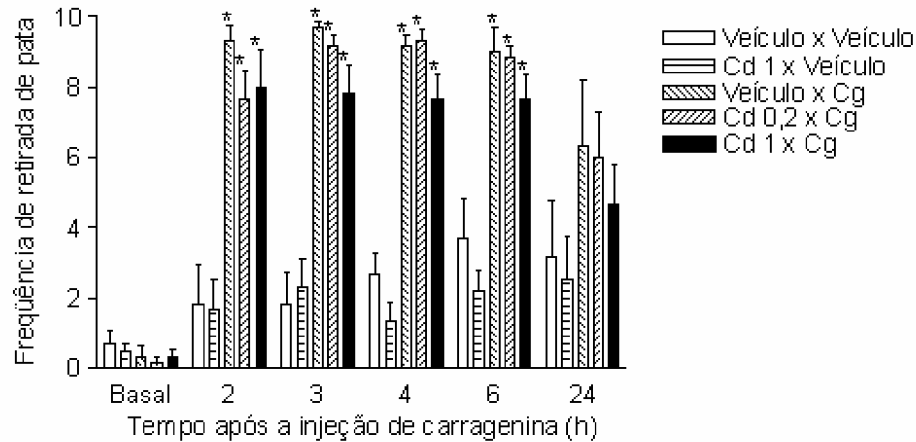


Fig. 12 – Efeito induzido pelo sulfato de cádmio (0,2 ou 1 mg/kg; i.p.; -24 h) sobre a frequência de retirada de pata e sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (1%, 50 μ l, i.pl.) (n = 5). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo x veículo. (p < 0,05).

A fim de avaliar se o efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina é dependente de sua conversão nas coenzimas FMN e FAD, foi usado um inibidor da flavoquinase, o cádmio, na forma de sulfato de cádmio. A administração do sulfato de cádmio não alterou a frequência de retirada de pata em animais que receberam injeção i.pl. de veículo 24 h depois. A alodínia mecânica induzida pela administração de carragenina também não foi alterada pelo pré-tratamento (-24 h) dos animais com sulfato de cádmio (FIG 12).

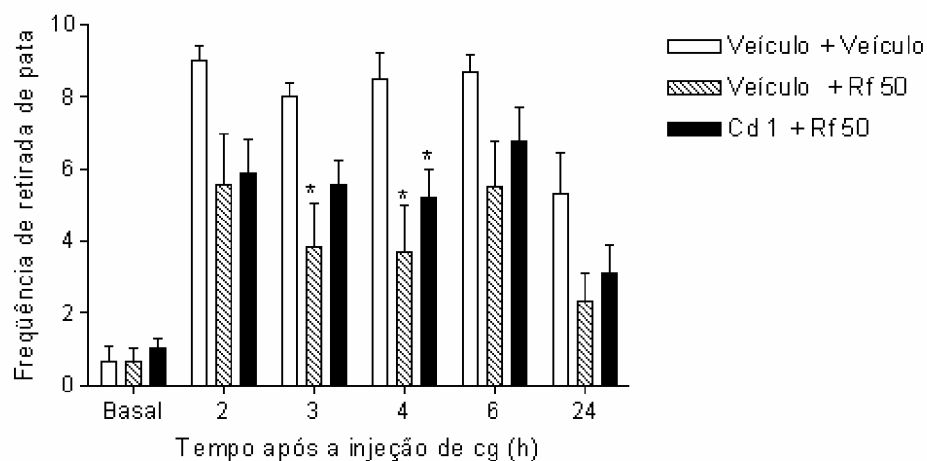


Fig. 13 – Efeito induzido pelo sulfato de cádmio (1 mg/kg; i.p.; -24 h) sobre a atividade antinociceptiva da riboflavina (50 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina (1%, 50 μ l, i.pl.) (n = 5). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (p < 0,05).

No protocolo seguinte, os animais foram tratados com veículo ou sulfato de cádmio. A administração de carragenina e o tratamento com a riboflavina ou veículo foram realizados 24 h depois. O tratamento com sulfato de cádmio não alterou a atividade antinociceptiva da riboflavina (FIG 13).

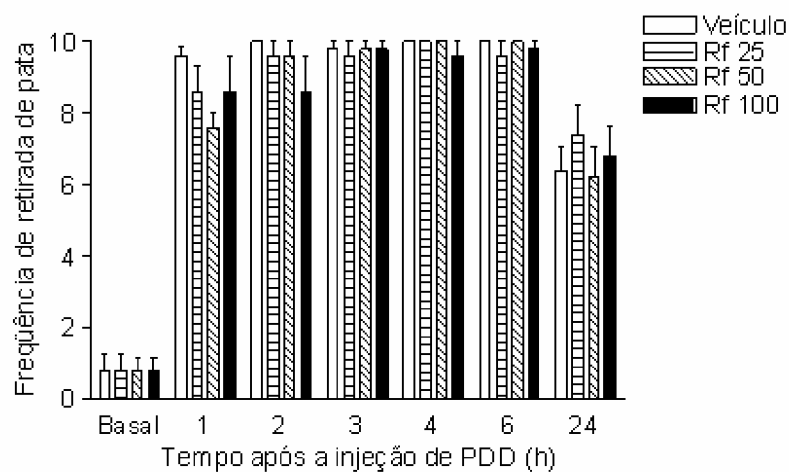


Fig. 14 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) sobre a alodínia mecânica induzida por PDD (0,1 μ g; 50 μ l; i.pl.) (n = 5).

Com o objetivo de melhor caracterizar as atividades da riboflavina, foi avaliado o efeito induzido por essa vitamina sobre a alodínia mecânica induzida por PDD, um ativador de PKC. O protocolo experimental usado foi semelhante àquele realizado para a avaliação da atividade antinociceptiva da riboflavina no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina. PDD induziu resposta nociceptiva intensa na primeira hora após sua injeção. A resposta atingiu intensidade máxima 2 h após a injeção e se manteve elevada por, pelo menos, 24 h. A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg), administrada imediatamente e 2 h após a injeção de PDD, não inibiu a alodínia mecânica induzida por esse estímulo inflamatório (FIG 14).

4.3 Avaliação da interação entre a riboflavina e a morfina no modelo da resposta nociceptiva induzida por formaldeído

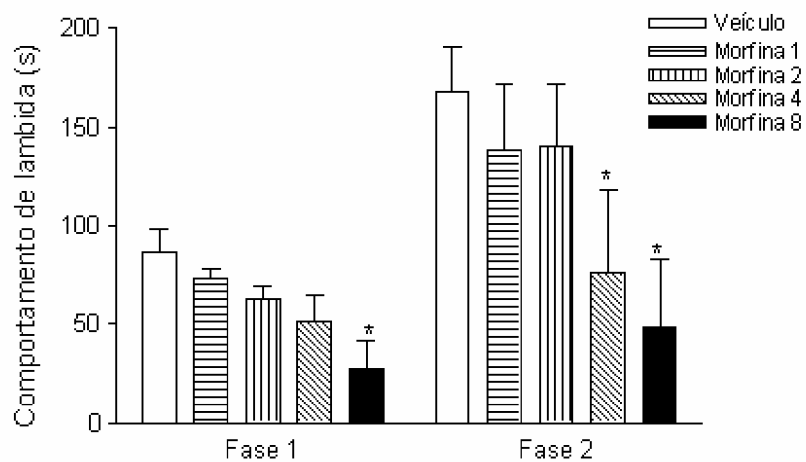


Fig. 15 – Efeito induzido pela morfina (1, 2, 4 ou 8 mg/kg; i.p.; - 30 min) sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (0,92%; 20 µl; s.c.) (n = 6). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (p < 0,05).

A morfina (1, 2, 4 ou 8 mg/kg) foi administrada por via i.p., 30 min antes da injeção de formaldeído. A maior dose da morfina inibiu a primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Em relação à segunda fase, foi observada inibição após o tratamento com as doses de 4 ou 8 mg/kg da morfina (FIG 15).

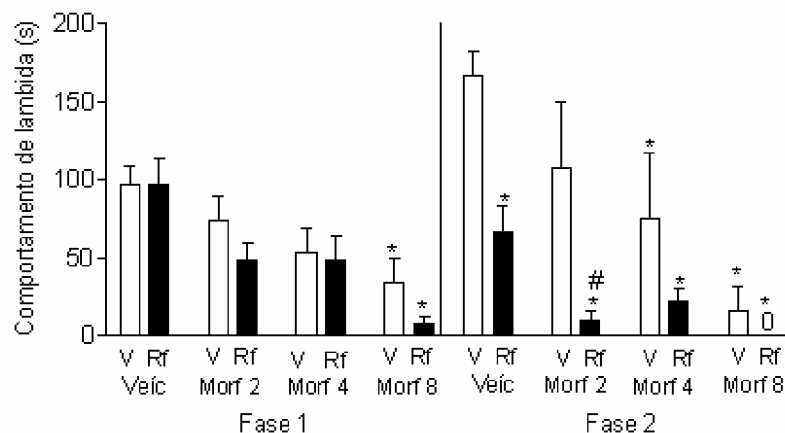


Fig. 16 – Efeito induzido pela morfina (2, 4 ou 8 mg/kg; i.p.; - 30 min), pela riboflavina (25 mg/kg; i.p.; - 30 min) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (0,92%; 20 µl; s.c.) (n = 6). * e # diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo + veículo e veículo + morfina 2, respectivamente ($p < 0,05$).

A riboflavina (25 mg/kg) foi administrada de forma simultânea com a morfina (2, 4 ou 8 mg/kg), 30 min antes da administração de formaldeído. Nesse protocolo, as doses de 2, 4 ou 8 mg/kg da morfina inibiram a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em 35, 55 e 90%, respectivamente. Quando associadas à riboflavina, essas mesmas doses da morfina promoveram inibição de 95, 87 e 100%, respectivamente (FIG 16). Nesse protocolo, a riboflavina (25 mg/kg) inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

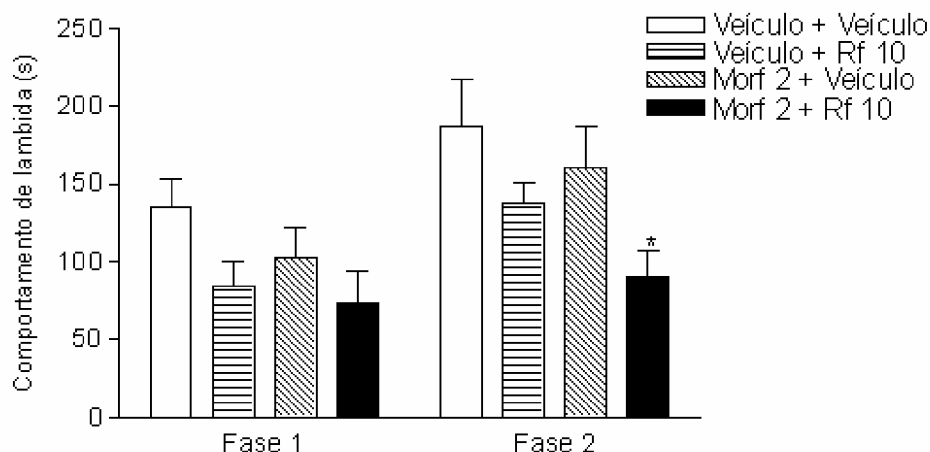


Fig. 17 – Efeito induzido pela morfina (2 mg/kg; i.p.; - 30 min), pela riboflavina (10 mg/kg; i.p.; - 30 min) e pela associação morfina-riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (0,92%; 20 μ l; s.c.) (n = 6). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo + veículo ($p < 0,05$).

Uma vez que no protocolo anterior a dose da riboflavina usada inibiu parcialmente a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, novo protocolo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar se seria possível observar um efeito antinociceptivo induzido pela associação da riboflavina e da morfina, em doses que, isoladamente, não induziam tal efeito. A riboflavina (10 mg/kg) foi administrada de forma simultânea com a morfina (2 mg/kg), 30 min antes da injeção de formaldeído. De forma isolada, a morfina e a riboflavina não inibiram a segunda fase da resposta nociceptiva. Entretanto, quando esses fármacos foram associados, houve inibição estatisticamente significativa (51%) da segunda fase da resposta nociceptiva (FIG 17).

4.4 Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata em ratos

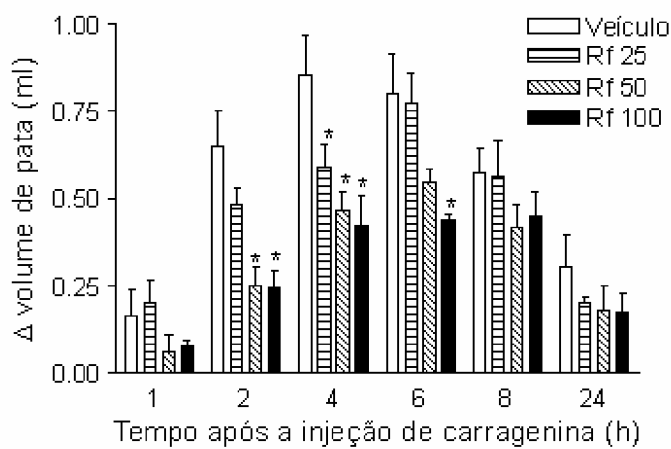


Fig. 18 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%; 50 μ l; i.pl.) (n = 5). Os volumes basais dos grupos tratados com veículo, Rf 25, Rf 50 e Rf 100 foram $1,20 \pm 0,04$; $1,20 \pm 0,04$; $1,23 \pm 0,04$; $1,16 \pm 0,02$ ml; respectivamente. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

Também foi avaliado o efeito induzido pela riboflavina sobre outro componente da resposta inflamatória, o edema de pata. A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg) foi administrada imediatamente e 2 h após a injeção de carragenina. Esse protocolo é semelhante àquele realizado com o modelo de alodínia mecânica, uma vez que o edema de pata induzido por carragenina também é de longa duração. A riboflavina inibiu o edema de pata induzido por carragenina, sendo a duração desse efeito relacionada com a dose. Assim, as doses da riboflavina de 50 ou 100 mg/kg reduziram o edema até a quarta e sexta horas após a injeção de carragenina, respectivamente. A menor dose da riboflavina inibiu o edema apenas na quarta hora após a injeção de carragenina (FIG 18).

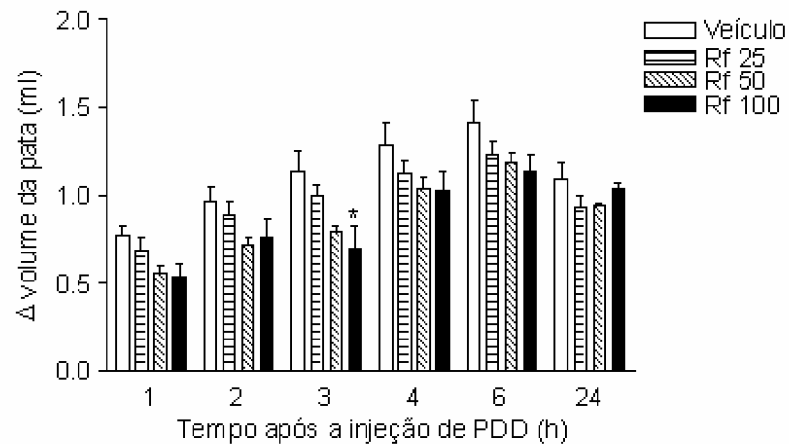


Fig. 19 – Efeito induzido pela riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) sobre o edema de pata induzido por PDD (1 μ g; 50 μ l; i.pl.) (n = 5). Os volumes basais dos grupos tratados com veículo, Rf 25, Rf 50 e Rf 100 foram $1,03 \pm 0,04$; $1,04 \pm 0,03$; $1,05 \pm 0,04$ e $1,03 \pm 0,03$ ml; respectivamente. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

O efeito induzido pela riboflavina também foi avaliado no modelo de edema de pata induzido por PDD. O volume de pata aumentou gradualmente após a injeção do estímulo inflamatório e manteve-se elevado por, pelo menos, 24 h. A riboflavina (25, 50 ou 100 mg/kg) foi administrada imediatamente e 2 h após a injeção de PDD, sendo esse protocolo justificado pelos motivos expostos anteriormente, uma resposta inflamatória de longa duração induzida por PDD e um curto $T_{1/2}$ de eliminação da riboflavina. Ao contrário do observado no modelo de alodínia mecânica, a dose de 100 mg/kg da riboflavina inibiu o edema de pata induzido por PDD. Entretanto, essa inibição foi de menor magnitude e duração quando comparada com aquela induzida pela riboflavina no modelo de edema de pata induzido por carragenina (FIG 19).

4.5 Avaliação **do efeito** induzido pela **riboflavina sobre a** migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina em ratos

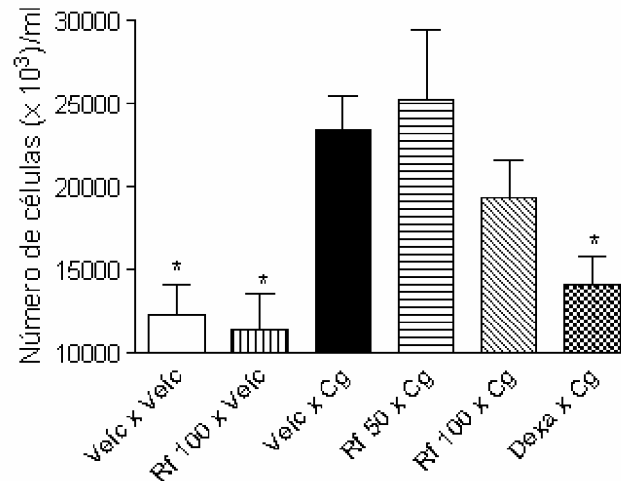


Fig. 20 – Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg; s.c.; 0 e 2 h) sobre a migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina (500 μ g/1 ml) (n = 7). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo x carragenina ($p < 0,05$).

A riboflavina (50 ou 100 mg/kg) não inibiu a migração celular induzida pela injeção i.p. de carragenina (FIG 20). Entretanto, essa resposta foi inibida de forma marcante pelo pré-tratamento com a dexametasona (1 mg/kg, s.c., -1 h).

4.6 Avaliação do efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta febril induzida por LPS em ratos

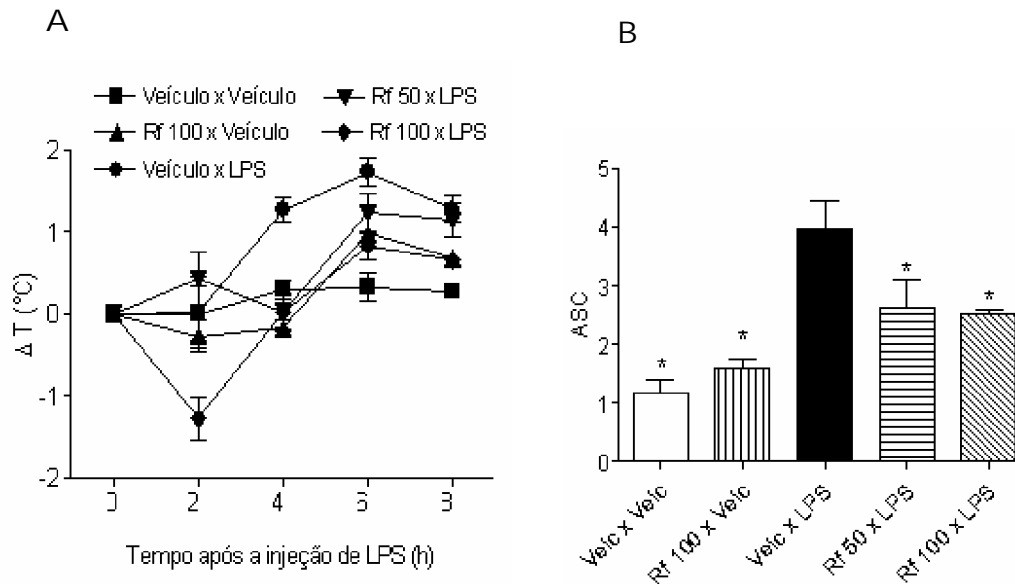


Fig. 21 – (A) Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg; i.p.; 0 e 2 h) sobre a temperatura colônica e sobre a resposta febril induzida por LPS (50 µg/kg; i.v.). (B) ASC do efeito induzido pela riboflavina sobre a temperatura colônica e sobre a resposta febril induzida por LPS (n=6). As temperaturas basais dos grupos tratados com veículo x veículo, Rf 100 x veículo, veículo x LPS, Rf 50 x LPS e Rf 100 x LPS foram $36,8 \pm 0,13$; $36,8 \pm 0,06$; $37,0 \pm 0,12$; $37,0 \pm 0,13$ e $37,1 \pm 0,10$ °C; respectivamente. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo x LPS ($p < 0,05$).

Nos protocolos anteriores, foram demonstrados os efeitos induzidos pela riboflavina em modelos que envolvem a aplicação de estímulos térmicos ou químicos que induzem resposta nociceptiva e/ou inflamatória local. Assim, no próximo protocolo, foi avaliado o efeito induzido pela riboflavina sobre uma resposta inflamatória sistêmica. Para isso, foi usado o modelo de resposta febril induzida por LPS. A riboflavina (50 ou 100 mg/kg) foi administrada imediatamente e 2 h após a injeção do estímulo inflamatório. Esse protocolo é semelhante àqueles realizados com

modelo de alodínia mecânica e edema de pata, uma vez que a resposta febril induzida por LPS também apresenta um longo curso temporal. Na segunda hora após a injeção de LPS, não houve elevação da temperatura colônica dos animais tratados com LPS. Além disso, os animais do grupo tratado com LPS e com a dose de 100 mg/kg da riboflavina apresentaram hipotermia. A temperatura colônica do grupo tratado com LPS aumentou gradualmente, atingindo valor máximo 6 h após a injeção. A riboflavina (50 ou 100 mg/kg) inibiu a resposta febril induzida por LPS na quarta hora após a injeção do estímulo inflamatório. O efeito antipirético induzido por essa vitamina não foi mais observado a partir da sexta hora (FIG 21). O experimento foi interrompido na oitava hora, momento em que a temperatura colônica começou a retornar para valores próximos aos basais. Além disso, nesse momento, iniciou-se o período noturno, o que resulta em aumento da atividade motora dos animais e, conseqüentemente, elevação da temperatura colônica.

4.7 Avaliação **do efeito** induzido pela **riboflavina sobre a** formação de tecido fibrovascular induzido por implante s.c. de disco de algodão em camundongos

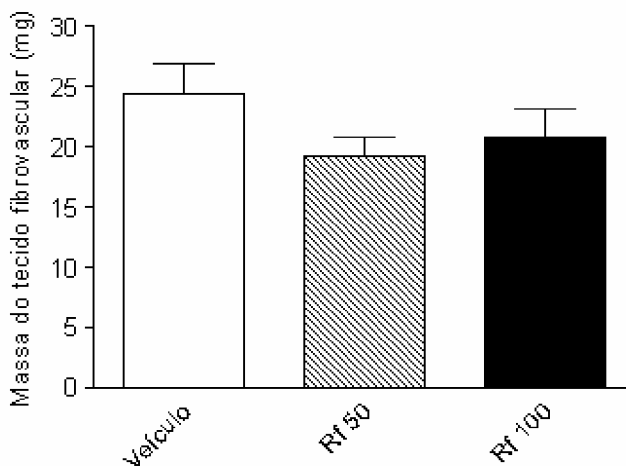


Fig. 22 – Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg.dia; i.p.; 7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão (n = 10).

Após verificar que a riboflavina apresenta atividade antiinflamatória em modelos de inflamação aguda de caráter local ou sistêmico, foi investigado o efeito induzido por essa vitamina em um modelo de inflamação prolongada, induzida por implante de um disco de algodão no tecido subcutâneo da região dorsal posterior de camundongos. A riboflavina (50 ou 100 mg/kg), administrada uma vez ao dia, durante sete dias, não inibiu a formação de tecido fibrovascular induzida pelo implante (FIG 22).

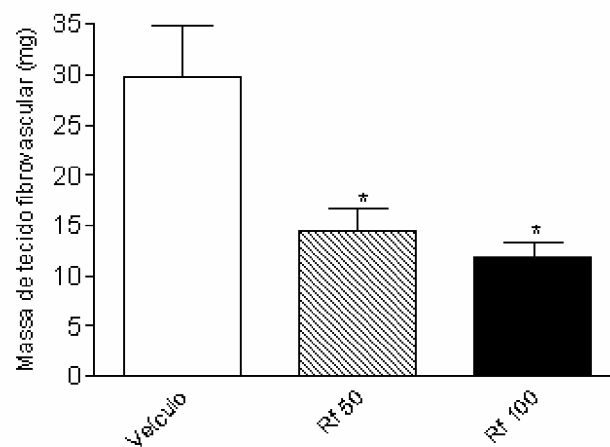


Fig. 23 – Efeito induzido pela riboflavina (50 ou 100 mg/kg. 2 x dia; i.p.; 7 dias) sobre a formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão (n = 10). * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (p < 0,05).

Nos protocolos anteriores, foi demonstrada a utilidade de realizar administrações repetidas da riboflavina em modelos em que a resposta a ser avaliada é de longa duração, como é o caso da avaliação da formação de tecido fibrovascular induzida por implante s.c. de disco de algodão. Com o objetivo de obter maior concentração tecidual da riboflavina por períodos mais prolongados, esse fármaco foi administrado duas vezes ao dia, durante sete dias após o implante do disco de algodão. Com esse esquema de tratamento, a riboflavina (50 ou 100 mg/kg) inibiu a formação de tecido fibrovascular induzida pelo implante (FIG 23).

4.8 Resumo dos resultados

Modelo	Resultado
Haste girante	Ausência de efeito sobre o comportamento exploratório e sobre a permanência na haste
Campo aberto	
Formaldeído	Inibição da primeira fase (pequena extensão) e da segunda fase (maior extensão)
Placa quente	Aumento da latência induzido pela maior dose
Interação com morfina	Exacerbação do efeito antinociceptivo induzido pela morfina
Alodínia mecânica - carragenina	Inibição
Alodínia mecânica - PDD	Ausência de efeito
Edema de pata - carragenina	Inibição
Edema de pata - PDD	Inibição (pequena extensão)
Resposta febril	Inibição
Migração celular	Ausência de efeito
Formação de tecido fibrovascular	Inibição após tratamento prolongado com duas doses diárias

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram demonstrados os efeitos antinociceptivo e antiinflamatório induzidos pela riboflavina, uma vitamina do complexo B, em diferentes modelos experimentais. De forma semelhante ao que já foi demonstrado para outras vitaminas desse complexo, principalmente a tiamina, a piridoxina e a cianocobalamina, a riboflavina apresentou atividades antinociceptiva, antiedema, antipirética e inibiu a formação de tecido fibrovascular associada à inflamação.

Os primeiros protocolos realizados indicaram que a riboflavina, nas doses usadas, não promoveu incoordenação motora ou relaxamento muscular que pudessem comprometer a permanência dos animais na haste girante. Também não alterou o comportamento exploratório no modelo do campo aberto. Esses modelos são úteis para avaliar se determinados fármacos induzem incoordenação motora ou diminuição do tônus muscular, o que poderia comprometer a avaliação do comportamento nociceptivo e a interpretação dos resultados. Diversos fármacos, predominantemente aqueles que induzem efeito depressor central, apresentam essas atividades. Entre esses, podem ser citados os analgésicos opióides (MEERT & VERMEIRSCH, 2005) e antiepilépticos (KAYSER & CHRISTENSEN, 2000), fármacos usados no tratamento de diferentes condições dolorosas. Fornecendo suporte aos resultados do presente estudo, Granados-Soto *et al.* (2004) demonstraram que a riboflavina não induziu incoordenação motora em ratos.

Inicialmente, foi avaliado o efeito induzido pela riboflavina sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos. A resposta dos animais à administração s.c. de formaldeído apresenta duas fases que parecem envolver diferentes mecanismos (DUBUISSON & DENNIS, 1977). A primeira fase começa imediatamente após a injeção de formaldeído, dura em torno de 5 min e, provavelmente, envolve a estimulação química direta dos nociceptores, principalmente as fibras A δ e C (PUIG & SORKIN, 1995). Essa fase é inibida por opióides e por outros fármacos que induzem efeito analgésico principalmente por

ação no SNC. Também pode ser inibida por AINEs, entretanto, em doses superiores àquelas necessárias para inibir a segunda fase da resposta induzida por formaldeído (SANTOS *et al.*, 1998) ou para induzir efeito antiinflamatório em outros modelos experimentais (al-SWAYEH *et al.*, 2000). Após a primeira fase, há um período de 5 a 10 min no qual os animais apresentam um reduzido comportamento sugestivo de nocicepção. A segunda fase do comportamento nociceptivo inicia-se, aproximadamente, 15 min após a injeção de formaldeído, dura cerca de 15 min, no caso de camundongos, e está relacionada ao desenvolvimento de resposta inflamatória local e sensibilização de neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal. Essa fase da resposta é inibida por analgésicos opióides e AINEs, entre outras drogas (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; DUBNER & RUDA, 1992; TjøLSEN *et al.*, 1992; SEGUIN *et al.*, 1995).

No presente estudo, foi observado que a riboflavina inibiu a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. A inibição da primeira fase foi observada apenas no grupo tratado com a maior dose da riboflavina (100 mg/kg). A segunda fase da resposta nociceptiva foi inibida pelas doses de 50 ou 100 mg/kg, sendo que a redução do comportamento de lambida foi maior que aquela observada na primeira fase. Outros dois estudos demonstraram que a riboflavina inibe a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos (FRANÇA *et al.*, 2001) e em ratos (GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004). Nesses estudos, não foi observada inibição estatisticamente significativa da primeira fase da resposta nociceptiva, porém as doses usadas foram inferiores àquela usada no presente estudo e que induziu tal efeito. Uma vez que a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído é atribuída, principalmente, ao desenvolvimento de processo inflamatório no local da injeção do estímulo químico e é inibida por fármacos com atividade predominantemente antiinflamatória (TjøLSEN *et al.*, 1992), sugere-se que a atividade antinociceptiva da riboflavina esteja associada, principalmente, à inibição da produção ou da ação de mediadores inflamatórios. A atividade antinociceptiva da riboflavina na primeira fase da resposta induzida por

formaldeído só foi observada com uma dose dessa vitamina superior àquela necessária para inibir a segunda fase.

Também foi avaliado o efeito induzido pela riboflavina sobre o comportamento nociceptivo induzido por calor no modelo da placa quente. Considera-se que a resposta observada nesse modelo resulta da ativação direta de nociceptores pelo calor e depende de integração supra-espinhal (LE BARS *et al.*, 2001). Analgésicos opióides (LOH *et al.*, 1976), bem como outras drogas de ação predominantemente central, como antidepressivos tricíclicos (ROSLAND *et al.*, 1988) e antiepilépticos (MESDJIAN *et al.*, 1983), aumentam o tempo de permanência dos animais na placa quente, um resultado que é interpretado como antinociceção. A riboflavina, na maior dose usada, induziu efeito antinociceptivo nesse modelo.

Embora tenha sido observada inibição da primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído e da resposta nociceptiva no modelo da placa quente, esses efeitos só foram observados com doses superiores àquelas necessárias para inibir a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Sugere-se, assim, que a riboflavina apresenta um perfil farmacológico que se assemelha mais àquele de drogas antiinflamatórias. Resultados semelhantes, ou seja, inibição da primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído com doses superiores àquelas necessárias para inibir a segunda fase, já foram descritos para alguns AINEs (SANTOS *et al.*, 1998).

A fim de investigar o efeito induzido pela riboflavina sobre a nociceção associada a processos inflamatórios mais prolongados, foi usado o modelo de alodínia mecânica induzida pela injeção i.pl. de carragenina, uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas do gênero *Rhodophyceae* e composta, principalmente, por D-galactose sulfatada. A carragenina é muito pouco absorvida após administração s.c. e induz resposta inflamatória local (DI ROSA, 1972) que envolve migração celular, extravasamento de plasma e aumento da produção de vários mediadores inflamatórios, entre os quais NO, PGE₂ e citocinas (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Além dessas alterações, há sensibilização para estímulos diversos resultante de mudanças no fenótipo dos nociceptores e da facilitação da transmissão sináptica na medula espinhal. Essa sensibilização pode ser induzida pela exposição dos nociceptores a mediadores inflamatórios, entre os quais podem ser citados eicosanóides, citocinas, prótons, ATP, 5-HT, bradicinina e fator de crescimento de nervo (JULIUS & BASBAUM, 2001). Como resultado, podem ocorrer alodínia e hiperalgisia no tecido lesado e em tecidos adjacentes.

A International Association for the Study of Pain define hiperalgisia como o relato de dor mais intensa induzida por estímulo nocivo e alodínia como dor associada a estímulo não nocivo. Adaptando esses conceitos à experimentação animal, poder-se-ia descrever hiperalgisia como uma resposta nociceptiva mais intensa a um estímulo nocivo e alodínia como a resposta nociceptiva a um estímulo originalmente não nocivo. Em relação à alodínia mecânica induzida por carragenina, observa-se inibição por AINEs (VINEGAR *et al.*, 1987; FRANCISCHI *et al.*, 2002) e por outras drogas que inibem a produção ou ação de mediadores inflamatórios distintos dos eicosanóides (FERREIRA *et al.*, 1993; SUZUKI *et al.*, 2004), bem como por drogas de ação predominantemente central, como os analgésicos opióides (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Nesse modelo, a riboflavina, administrada 30 min antes, inibiu parcialmente a resposta nociceptiva 2 h após a injeção de carragenina, embora sem a ocorrência de diferença estatisticamente significativa. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que o $T_{1/2}$ de eliminação dessa vitamina é de cerca de 60 min (CHRISTENSEN, 1969). Logo, é provável que 2 h após a injeção do estímulo inflamatório, quando a resposta nociceptiva induzida por carragenina inicia-se, a concentração tecidual de riboflavina já se apresentava reduzida.

Levando em consideração que o $T_{1/2}$ de eliminação da riboflavina é curto e que a resposta nociceptiva induzida por carragenina apresenta um longo curso temporal, foi avaliado o efeito induzido por duas administrações dessa vitamina. Nesse

protocolo, a riboflavina foi administrada imediatamente e 2 h após a carragenina. Com esse esquema de tratamento, essa vitamina induziu efeito antinociceptivo que teve duração e intensidade relacionadas à dose. A manutenção da concentração tecidual mais elevada da riboflavina com administrações repetidas poderia explicar, também, o prolongamento do efeito antinociceptivo observado. Granados-Soto *et al.* (2004) demonstraram que a riboflavina reduz a resposta nociceptiva induzida por carragenina no modelo de hiperalgisia térmica, o que dá sustentação aos resultados obtidos no presente estudo. Mesmo com a administração de duas doses da riboflavina, o efeito antinociceptivo não se manteve após 4 h. Uma possibilidade é que o curto $T_{1/2}$ da riboflavina possa explicar essa observação.

Porém, em outro protocolo, no qual a riboflavina foi administrada 3 h após a injeção de carragenina, não foi observada inibição da resposta nociceptiva. Essa observação eliminaria a possibilidade de que o término do efeito induzido pela riboflavina no protocolo anterior (administração imediatamente e 2 h após carragenina) resultasse, exclusivamente, da redução da concentração tecidual dessa vitamina em torno de 6 h após a injeção do estímulo inflamatório. Assim, seria possível que a riboflavina inibisse, de forma mais marcante, a síntese ou a ação dos mediadores responsáveis pelo desenvolvimento ou pela fase inicial da resposta nociceptiva induzida pela carragenina. Outra possibilidade é que a administração da riboflavina 3 h após a injeção da carragenina, quando já houve síntese local de mediadores inflamatórios e sensibilização dos nociceptores, não seja capaz de reverter a resposta nociceptiva já estabelecida.

A resposta induzida por carragenina envolve migração celular e produção de diversos mediadores inflamatórios no local de injeção. À medida que a resposta se desenvolve, as substâncias produzidas e liberadas no sítio inflamatório variam. Inicialmente, há liberação de 5-HT e produção de eicosanóides. Em seguida, há migração de neutrófilos para o sítio de injeção e liberação de citocinas (VINEGAR *et al.*, 1987). Foi demonstrado que a riboflavina reduz a síntese de citocinas inflamatórias e quimiocinas induzida por LPS (TOYOSAWA *et al.*, 2004; KODAMA *et*

al., 2005). Esses mediadores têm papel importante no desenvolvimento da resposta nociceptiva induzida por diferentes estímulos (CUNHA *et al.*, 1992; CUNHA *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2004) e a inibição de sua síntese pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina.

Na tentativa de investigar os mecanismos por meio dos quais a riboflavina induz seu efeito antinociceptivo, foi usado o sulfato de cádmio. O cádmio é um conhecido poluente e afeta a atividade de diversos sistemas enzimáticos, além de causar danos neurológicos, hepáticos e renais (NOVELLI *et al.*, 1998; MINAMI *et al.*, 2001). Esse cátion divalente inibe a primeira etapa do metabolismo da riboflavina, a fosforilação dessa vitamina à coenzima FMN, reação catalisada pela flavoquinase. A adição de 1 mM de cádmio a uma preparação contendo flavoquinase aumenta em cerca de três vezes o K_m dessa enzima. O efeito inibitório induzido pelo cádmio sobre a síntese de FMN, ao contrário do que é observado com mercúrio, outro cátion divalente, pode ser revertido pelo aumento da concentração da riboflavina. Isso sugere que o cádmio e a riboflavina ligam-se ao mesmo sítio na flavoquinase (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997).

A maior parte dos estudos que avaliaram o efeito inibitório induzido pelo cádmio sobre a síntese de FMN foi realizada *in vitro*, o que dificulta a definição de uma dose para ser usada *in vivo*. Além disso, outro fator que limita o uso do cádmio como ferramenta farmacológica *in vivo* é a sua elevada toxicidade, caracterizada por uma DL_{50} de aproximadamente 4,5 mg/kg em ratos (KERSHAW *et al.*, 1990). Uma vez que em experimentos preliminares foi observada toxicidade após a administração de 2 mg/kg de sulfato de cádmio, que equivale a 0,88 mg/kg de cádmio, a dose usada nos protocolos seguintes foi de 1 mg/kg, que não induziu toxicidade evidente. Como o efeito induzido pelo cádmio sobre a síntese de FMN pode ser reduzido em presença de concentrações elevadas da riboflavina (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997), não foi usada a maior dose dessa vitamina, mas uma dose intermediária (50 mg/kg),

capaz de induzir efeito antinociceptivo e com menor possibilidade de reverter o efeito induzido por esse cátion divalente.

A inibição da flavoquinase pelo cádmio resulta da interação desse íon com grupos sulfidríla presentes no sítio ativo da enzima ou em locais próximos a ele (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997). Esse mecanismo é semelhante àquele da inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pelo cádmio (CASALINO *et al.*, 2000). Além disso, o ditioneitol, um reagente utilizado em estudos bioquímicos e que previne a oxidação de grupos SH (tiol) de aminoácidos, protege tanto a flavoquinase (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1997) quanto a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (CASALINO *et al.*, 2000) da inativação pelo cádmio. A redução da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é mais evidente entre 24 e 48 h após a administração i.p. do cádmio, o que justificou o tratamento com esse cátion 24 h antes da injeção da riboflavina.

Inicialmente, foi verificado que os animais tratados com o cádmio apresentaram frequência de retirada de pata que não diferiu daquela dos animais tratados com salina. De forma semelhante, o cádmio *per se* não alterou a alodínia mecânica induzida por carragenina. Esses resultados foram importantes para validar o uso do cádmio no protocolo seguinte no qual se investigou o efeito induzido por esse cátion sobre a atividade antinociceptiva da riboflavina no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina. Uma vez que a atividade antinociceptiva não foi alterada pelo cádmio, sugere-se que essa não pode ser atribuída, exclusivamente, à conversão da riboflavina nas coenzimas FMN e, posteriormente, FAD. Dando suporte a essa hipótese, foram demonstrados outros efeitos induzidos pela riboflavina que parecem não depender da síntese das coenzimas FMN e FAD. Em modelos de lesão tecidual provocada por estresse oxidativo, é provável que a conversão da riboflavina em dihidrorriboflavina seja o principal mecanismo responsável pelo efeito induzido por essa vitamina (SEEKAMP *et al.*, 1999; HOANE *et al.*, 2005).

Entretanto, com os resultados do presente estudo, não é possível eliminar o envolvimento das coenzimas FMN e FAD no efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina. A dose do cádmio, administrada 24 h antes da realização do protocolo experimental, pode não ter inibido a atividade da enzima flavoquinase. Além disso, mesmo que haja inibição parcial da síntese de FMN com a dose do cádmio usada, é possível que seja de magnitude insuficiente para afetar a atividade antinociceptiva da riboflavina. Embora não tenham contribuído para o esclarecimento definitivo dos mecanismos associados ao efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina, esses resultados demonstram a necessidade de ferramentas farmacológicas mais adequadas que permitam avaliar, *in vivo*, o papel de FMN e FAD na expressão dos efeitos induzidos pela riboflavina.

O efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata induzido por carragenina também foi avaliado. Essa resposta inicia-se com o aumento do diâmetro vascular e do fluxo sanguíneo no local da lesão, o que também causa eritema e elevação da temperatura no sítio inflamatório. A permeabilidade vascular também se eleva, permitindo a passagem de proteínas para o interstício. O aumento da pressão coloidosmótica, resultante do acúmulo de proteínas no meio extracelular, induz extravasamento de líquido no local da lesão. Essas alterações vasculares que resultam no desenvolvimento do edema são induzidas por múltiplos mediadores inflamatórios que atuam de forma conjunta, entre os quais podem ser mencionados bradicinina (DAMAS & REMACLE-VOLON, 1992), eicosanóides, NO (SALVEMINI *et al.*, 1996) e citocinas diversas (CHEN *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 1995).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina, proposto por Winter *et al.* (1962), tem sido amplamente usado para a investigação da atividade antiinflamatória de fármacos. O desenvolvimento do edema é inibido em extensão variável por drogas que inibem a produção e a ação de diferentes mediadores inflamatórios. Entre essas drogas podem ser mencionadas AINEs (VINEGAR *et al.*, 1987; FRANCISCHI *et al.*, 2002), AIEs (WINTER *et al.*, 1962; BURITOVA *et al.*, 1996), antagonistas de

receptores de bradicinina (DAMAS & REMACLE-VOLON, 1992), de 5-HT e de histamina (DI ROSA, 1972).

A riboflavina foi administrada imediatamente e 2 h após a injeção de carragenina. Esse protocolo é semelhante àquele realizado no modelo de alodínia mecânica, uma vez que o edema de pata induzido por carragenina, assim como a resposta nociceptiva, é de longa duração. Foi observado que a riboflavina também inibiu o edema de pata induzido por carragenina, sendo a duração desse efeito relacionada à dose. Outro estudo obteve resultado semelhante ao avaliar o efeito induzido pela riboflavina sobre o edema de pata induzido por carragenina (GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004). Além disso, França *et al.* (2001) e Verdrengh & Tarkowski (2005) demonstraram que o edema de pata induzido por formaldeído e óleo de oliva em camundongos é inibido pelo tratamento com a riboflavina. Diferentes estudos demonstraram que algumas citocinas (IL-1 β , TNF- α), que têm síntese inibida pela riboflavina, são importantes para o desenvolvimento do edema induzido por carragenina (CHEN *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 1995). Assim, é possível que o efeito antiedema induzido pela riboflavina possa resultar, em parte, da inibição da síntese de algumas citocinas inflamatórias.

O efeito induzido pela riboflavina sobre a migração celular observada após a injeção i.p. de carragenina em ratos também foi avaliado. Há evidências de que a migração celular induzida por esse estímulo resulta da ação de vários mediadores inflamatórios, entre os quais podem ser mencionados eicosanóides (CHIABRANDO *et al.*, 1989), bradicinina (DAMAS *et al.*, 1990), NO (TRACEY *et al.*, 1995) e citocinas (FRÖDE *et al.*, 2001). Embora a riboflavina iniba a síntese de alguns desses mediadores (TOYOSAWA *et al.*, 2004; KODAMA *et al.*, 2005), essa vitamina não inibiu a migração celular nesse modelo experimental. A ausência de atividade da riboflavina provavelmente não resulta do uso de doses inadequadas, uma vez que as mesmas doses inibiram outros componentes da resposta inflamatória induzida por carragenina, como o edema de pata e a alodínia mecânica. Esses efeitos distintos

provavelmente resultam do envolvimento de diferentes conjuntos de mediadores na indução da alodínia mecânica, do edema e da migração celular por carragenina.

A fim de caracterizar de forma mais ampla os efeitos antinociceptivo e antiedema induzidos pela riboflavina, foi usado o PDD, um ativador da PKC. Essa enzima encontra-se ativada durante processos inflamatórios e tem diferentes alvos celulares. A PKC fosforila a proteína quinase A, induz liberação do precursor da síntese de eicosanóides, o ácido araquidônico, e estimula a expressão do gene da COX-2 (WANG *et al.*, 2001). Ativadores dessa enzima induzem migração celular (de YOUNG *et al.*, 1989), produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (KONTNY *et al.*, 1999) e aumento da excitabilidade de nociceptores (SCHEPELMANN *et al.*, 1993; LENG *et al.*, 1996). Além disso, a injeção i.pl. de PDD induz comportamento de lambida de pata, alodínia térmica e mecânica e edema (SOUZA *et al.*, 2002).

A riboflavina não reduziu a alodínia mecânica induzida por PDD quando administrada imediatamente e 2 h após a injeção do estímulo. Esse esquema de tratamento é semelhante ao usado no protocolo experimental no qual a riboflavina inibiu a alodínia mecânica induzida por carragenina. A resposta nociceptiva induzida por PDD parece não ser dependente da síntese de mediadores inflamatórios, mas resultar da ativação direta de nociceptores (COSTA, 2004). Embora a riboflavina não tenha inibido a resposta nociceptiva, essa vitamina inibiu parcialmente o edema de pata induzido por PDD. O efeito antiedema induzido pela riboflavina foi mais evidente no modelo induzido por carragenina do que no modelo induzido por PDD. Essa inibição, ainda que parcial, poderia ser explicada pelo fato de alguns dos mediadores importantes para o desenvolvimento de edema induzido por PDD e carragenina serem comuns (COSTA, 2004). Por sua vez, a ativação direta de nociceptores parece ser o mecanismo mais importante para a indução da resposta nociceptiva induzida por ativadores de PKC (SCHEPELMANN *et al.*, 1993; LENG *et al.*, 1996). Portanto, sugere-se que os efeitos distintos induzidos pela riboflavina nos modelos citados resultam de diferentes mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dessas respostas e reforçam a hipótese de que o efeito induzido

pela riboflavina está associado, principalmente, à inibição da síntese de mediadores inflamatórios.

A fim de avaliar o efeito induzido pela riboflavina sobre uma resposta inflamatória de caráter sistêmico, foi usado o modelo de resposta febril induzida por LPS em ratos. A injeção i.v. de LPS induziu resposta febril que se estabeleceu de forma lenta, sendo inibida pela riboflavina. Na segunda hora após a injeção de LPS, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg apresentaram redução da temperatura colônica. Apesar disso, a inibição da resposta febril não pode ser atribuída exclusivamente à hipotermia resultante da associação entre LPS e a maior dose da riboflavina. Essa conclusão resulta do fato de que uma dose da riboflavina (50 mg/kg) que não induziu hipotermia atenuou a resposta febril de forma semelhante à dose de 100 mg/kg.

Estudos recentes demonstraram que a administração i.v. da riboflavina, 6 h após a injeção de LPS, inibiu a produção de NO e reduziu de forma marcante as concentrações plasmáticas de diversas citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , proteína quimiotática de monócitos 1 e proteína inflamatória de macrófago 2 (TOYOSAWA *et al.*, 2004; KODAMA *et al.*, 2005). Uma vez que as citocinas IL-1 β (LONG *et al.*, 1990), IL-6 (LeMAY *et al.*, 1990) e IFN γ (DINARELLO *et al.*, 1984) têm papel fundamental no desenvolvimento da resposta febril induzida por LPS, é possível que a inibição da sua síntese contribua para a atividade antipirética da riboflavina.

A fim de avaliar se a riboflavina, além de inibir parâmetros inflamatórios agudos, inibe uma resposta inflamatória de longa duração, foi investigado seu efeito sobre o crescimento de tecido fibrovascular induzido por implante s.c. de disco de algodão. A presença desse material estranho induz, inicialmente, acúmulo de líquido e proteínas, além de migração de neutrófilos para o ponto do implante. Desenvolve-se então, ao redor do disco de algodão, uma cápsula de tecido fibroso e vascularizado que contém fibroblastos e células mononucleares. O crescimento desse tecido é

inibido por vários AINEs e AIEs (SWINGLE & SHIDEMAN, 1972; BAILEY *et al.*, 1982) e outras drogas, como inibidores da síntese de NO (JANG *et al.*, 2000) e talidomida (BELO *et al.*, 2001).

Nesse modelo, a massa de tecido fibrovascular dos grupos tratados com uma dose diária da riboflavina durante sete dias não diferiu daquela do grupo tratado com veículo. Entretanto, como discutido anteriormente, o $T_{1/2}$ de eliminação dessa vitamina é curto e o disco de algodão representa um estímulo inflamatório prolongado. Por esse motivo, foi realizado novo protocolo no qual a riboflavina foi administrada em intervalos de 12 h, durante sete dias. Com esse tratamento, essa vitamina inibiu o crescimento de tecido fibrovascular induzido pelo implante. Os resultados apresentados anteriormente demonstraram a atividade antiinflamatória da riboflavina em respostas inflamatórias agudas. O efeito antiinflamatório induzido por essa vitamina no modelo de formação de tecido fibrovascular induzido por implante de disco de algodão demonstra que a riboflavina inibe, também, a fase proliferativa da resposta inflamatória. Uma vez que algumas citocinas e quimiocinas apresentam atividade pró-angiogênica (SCAPINI *et al.*, 2004; BARCELOS *et al.*, 2005), é possível que a inibição da produção de alguns desses mediadores (TOYOSAWA *et al.*, 2004; KODAMA *et al.*, 2005) esteja associada ao efeito inibitório induzido pela riboflavina sobre a formação de tecido fibrovascular.

Os resultados observados representam motivo de grande interesse uma vez que a riboflavina é uma droga cujo uso clínico é aprovado e está associado a uma incidência reduzida de reações adversas em adultos e crianças (TANAKA *et al.*, 1997a; SCHOENEN *et al.*, 1998; BOEHNKE *et al.*, 2004). Entretanto, o uso da riboflavina como fármaco analgésico ainda é restrito ao tratamento de condições dolorosas que podem resultar da sua deficiência. O efeito antinociceptivo induzido pela riboflavina indica a perspectiva do seu uso, de forma isolada ou associada a outros fármacos que apresentam atividade analgésica, para o alívio de diferentes condições dolorosas que não estão associadas à deficiência dessa vitamina. A exacerbação do efeito induzido por AINEs por vitaminas do complexo B,

principalmente tiamina, piridoxina e cianocobalamina, já foi demonstrada em modelos experimentais (BARTOSZYK & WILD, 1989; REYES-GARCIA *et al.*, 1999) e em estudos clínicos (BRUGGEMANN *et al.*, 1990; KUHLWEIN *et al.*, 1990). O uso associado da riboflavina também poderia permitir a redução da dose de outros fármacos, como os analgésicos opióides e, assim, reduzir a incidência de reações adversas que podem ocorrer após o seu uso. Com o objetivo de investigar essa possibilidade, avaliou-se a interação entre a riboflavina e a morfina no modelo de resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

A riboflavina aumentou, de forma marcante, o efeito antinociceptivo induzido pela morfina, sendo que a associação de uma dose ineficaz do opióide a essa vitamina induziu efeito semelhante àquele induzido pela maior dose da morfina. Além disso, a maior dose do opióide, quando associada à riboflavina, aboliu a resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Representando motivo de maior interesse, foi observado que a associação de uma dose ineficaz da morfina com uma dose ineficaz da riboflavina induziu efeito antinociceptivo. Os resultados permitem propor que a riboflavina seja um fármaco útil para pacientes tratados com a morfina ao possibilitar a obtenção de efeito analgésico de maior magnitude e a redução da dose do opióide.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que a riboflavina apresenta atividades antinociceptiva, antiedema e antipirética e inibe o crescimento de tecido fibrovascular associado à inflamação. Seus efeitos, provavelmente, resultam de múltiplos mecanismos. Esses resultados, associados ao fato de que a riboflavina é uma droga aprovada para uso clínico, apresenta segurança bem estabelecida e aumenta o efeito analgésico induzido pela morfina, podem dar suporte a estudos clínicos que avaliem o uso dessa vitamina em condições patológicas que não estão associadas a sua deficiência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

al-SWAYEH, O.A.; CLIFFORD, R.H.; del SOLDATO, P.; MOORE, P.K. A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 129, n. 2, p. 343-350, jan. 2000.

BAILEY, P.J.; STURM, A.; LOPEZ-RAMOS, B. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexamethasone and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 31, n. 7, p. 1213-1218, apr. 1982.

BANDYOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, A.K.; DATTA, A.G. Effect of cadmium, mercury and copper on partially purified hepatic flavokinase of rat. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 167, n. 1-2, p. 73-80, feb. 1997.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; VIEIRA, L.Q.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v. 78, n. 2, p. 352-358, aug. 2005.

BARTOSZYK, G.D.; WILD, A. B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test. *Neurosc. Lett.*, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 95-100, jun. 1989.

BARTOSZYK, G.D.; WILD, A. Antinociceptive effects of pyridoxine, thiamine, and cyanocobalamin in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 585, p. 473-476, 1990.

BAXTER, T. Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1647, n. 1-2, p. 36-41, apr. 2003.

BELO, A.V.; FERREIRA, M.A.N.D.; BOSCO, A.A.; MACHADO, R.D.P.; ANDRADE, S.P. Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. *Inflammation*, New York, v. 25, n. 2, p. 91-96, apr. 2001.

BERNSTEIN, A.L.; DINESEN, J.S. Effect of pharmacologic doses of vitamin B6 on carpal tunnel syndrome, electroencephalographic results, and pain. *J. Am. Coll. Nutr.*, New York, v. 12, n. 1, p. 73-76, feb. 1993.

BOEHNKE, C.; REUTER, U.; FLACH, U.; SCHUH-HOFER, S.; EINHÄUPL, K.M.; ARNOLD, G. High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre. *Eur. J. Neurol.*, Oxford, v. 11, n. 7, p. 475-477, jul. 2004.

BROWER, V. New paths to pain relief. *Nat. Biotechnol.*, New York, v. 18, n. 4, p. 387-391, apr. 2000.

BRUGGEMANN, G.; KOEHLER, C.O.; KOCH, E.M. Results of a double-blind study of diclofenac + vitamin B1, B6, B12 versus diclofenac in patients with acute pain of the lumbar vertebrae. A multicenter study. *Klin. Wochenschr.*, Berlin, v. 68, n. 2, p. 116-120, jan. 1990.

BURITOVA, J.; HONORÉ, P.; CHAPMAN, V.; BESSON, J-M. Enhanced effects of co-administered dexamethasone and diclofenac on inflammatory pain processing and associated spinal c-Fos expression in the rat. *Pain*, Amsterdam, v. 64, n.3, p. 559-568, mar. 1996.

CARETHERS, M. Diagnosing vitamin B₁₂ deficiency, a common geriatric disorder. *Geriatrics*, Minneapolis, v. 43, n. 3, p. 89-112, mar. 1988.

CASALINO, E.; CALZARETTI, G.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. Cadmium-dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 383, n. 2, p. 288-295, nov. 2000.

CHEN, Y.L.; Le VRAUX, V.; GIROUD, J.P.; CHAUVELOT-MOACHON, L. Anti-tumor necrosis factor properties of non-peptide drugs in acute-phase responses. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 271, n. 2-3, p. 319-327, dec. 1994.

CHIABRANDO, C.; CASTELLI, M.G.; COZZI, E.; FANELLI, R.; CAMPOLEONI, A.; BALOTTA, C.; LATINI, R.; GARATTINI, S. Antiinflammatory action of salicylates: aspirin is not a prodrug for salicylate against rat carrageenin pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 257-264, jan. 1989.

CHRISTENSEN, S. Studies on riboflavin metabolism in the rat. II. Metabolic flavin elimination after oral or intraperitoneal administration of riboflavin-5'-phosphate. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v. 27, n.1, p. 34-40, 1969.

CLAUS, D.; NEUNDORFER, B.; WARECKA, K. The influence of vitamin B6 deficiency on somatosensory stimulus conduction in the rat. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.*, Heidelberg, v. 234, n. 2, p. 102-105, 1984.

COELHO, M.M.; SOUZA, G.E.; PELA, I.R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 263, n. 2, p. R423-R427, aug. 1992.

COIMBRA, C.G.; JUNQUEIRA, V.B.C. High doses of riboflavin and the elimination of dietary red meat promote the recovery of some motor functions in Parkinson's disease patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1409-1417, oct. 2003.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88.

COSTA, K.A. Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: caracterização e comparação com as respostas induzidas por carragenina. 2004. 113p. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2004.

CUNHA, F.Q.; HELUY-NETO, N.E.; KLEIN, A.; SOUZA, G.E.; FERREIRA, S.H. Failure of PAF-acether to induce in vivo neutrophil migration. *Agents Actions*, Basel, v. 25, n. 1-2, p. 191-194, aug. 1988.

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. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 107, n. 3, p. 660-664, nov. 1992.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 130, n. 6, p. 1418-1424, jul. 2000.

DAKSHINAMURTI, K.; SINGER, W.D.; PATERSON, J.A. Effect of pyridoxine deficiency in the neuronally mature rat. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 57, n. 2, p. 161-167, dec. 1987.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 101, n. 2, p. 418-422, oct. 1990.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 81-86, jan. 1992.

de YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, Base, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, mar. 1989.

DINARELLO, C.A.; BERNHEIM, H.A.; DUFF, G. W.; LE, H.V.; NAGABHUSHAN, T.L.; HAMILTON, N.C.; COCEANI, F. Mechanism of fever induced by recombinant human interferon. *J. Clin. Invest.*, Oxford, v. 74, n. 3, p. 906-913, sep. 1984.

DIRIG, D.M.; ISAKSON, P.C.; YAKSH, T.L. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 285, n. 3, p. 1031-1038, jun. 1998.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 24, n. 2, p. 89-102, feb. 1972.

DUBNER, R.; RUDA, M.A. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.*, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 96-103, mar. 1992.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 161-174, dec. 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.*, Easton, v. 46, n. 3, p. 208-209, mar. 1957.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 107, n. 3, p. 385-393, mar. 1953.

Egan, L.J.; Mays, D.C.; Huntoon, C.J.; Bell, M.P.; Pike, M.G.; Sandborn, W.J.; Lipsky, J.J.; McKean, D.J. Inhibition of interleukin-1-stimulated NF- κ B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, n. 37, p. 26448-26453, sep. 1999.

ELLIS, J.M.; FOLKERS, K.; LEVY, M.; SHIZUKUISHI, S.; LEWANDOWSKI, J.; NISHII, S.; SCHUBERT, H.A.; ULRICH, R. Response of vitamin-B6 deficiency and the carpal tunnel syndrome to pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 79, n. 4, p. 7494-7498, apr. 1982.

EMERSON, G.A.; WURTZ, E.; JOHNSON, O.H. The antiriboflavin effect of galactoflavin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 160, p. 165-167, 1945.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 110, n. 3, p. 1227-1231, nov. 1993.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; de ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*, New York, v. 16, n. 1, p. 31-37, jul. 1978.

Fiebich, B.L.; Hofer, T.J.; Lieb, K.; Huell, M.; Butcher, R.D.; Schumann, G.; Schulze-Osthoff, K.; Bauer, J. The non-steroidal anti-inflammatory drug tepoxalin inhibits interleukin-6 and alpha₁-anti-chymotrypsin synthesis in astrocytes by preventing degradation of IκB-alpha. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 38, n. 9, p. 1325-1333, sep. 1999.

FOLKERS, K.; WOLANIUK, A.; VADHANAVIKIT, S. Enzymology of the response of the carpal tunnel syndrome to riboflavin and to combined riboflavin and pyridoxine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 81, n. 22, p. 7076-7078, nov. 1984.

FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.S.; ALMEIDA, K.R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 421, n. 3, p. 157-164, jun. 2001.

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

FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF-α and IL-1 in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, San Diego, v. 13, n. 3, p. 162-168, feb. 2001.

GOODYEAR-SMITH, F.; ARROLL, B. What can family physicians offer patients with carpal tunnel syndrome other than surgery? A systematic review of nonsurgical management. *Ann. Fam. Med.*, Leawood, v. 2, n. 3, p. 267-273, may-jun. 2004.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.*, Oxford, v. 47, n. 5, p. 963-991, may 1990.

GOSPE Jr., S.M.; OLIN, K.L.; KEEN, C.L. Reduced GABA synthesis in pyridoxine-dependent seizures. *Lancet*, London, v. 343, n. 8906, p. 1133-1134, may 1994.

GOTO, T.; MATSUO, N.; TAKAHASHI, T. CSF glutamate/GABA concentrations in pyridoxine-dependent seizures: etiology of pyridoxine-dependent seizures and the mechanisms of pyridoxine action in seizure control. *Brain Dev.*, Tokyo, v. 23, n. 1, p. 24-29, mar. 2001.

GRANADOS-SOTO, V.; TERÁN-ROSALES, F.; ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; FLORES-MURRIETA, F.J. Riboflavin reduces hyperalgesia and inflammation but not tactile allodynia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 492, n. 1, p. 35-40, may 2004.

GUTSTEIN, H.B.; AKIL H. Opioid analgesics. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006. cap. 21, p. 547-590.

GYÖRGY, P. Reminiscences on the discovery and significance of some of the B vitamins. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 91, n. 2, supl. 1, p. 5-9, feb. 1967.

HILLMAN, R.S. Hematopoietic agents. Growth factors, minerals, and vitamins. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.D. (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 54, p. 1487-1517.

HIRANO, H.; HAMAJIMA, S.; HORIUCHI, S.; NIITSU, Y.; ONO, S. Effects of B2-deficiency on lipoperoxide and its scavenging system in the rat lens. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Bern, v. 53, n. 4, p. 377-382, jul. 1983.

HOANE, M.R.; WOLYNIAK, J.G.; AKSTULEWICZ, S.L. Administration of riboflavin improves behavioral outcome and reduces edema formation and glial fibrillary acidic protein expression after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, Larchmont, v. 22, n. 10, p. 1112-1122, oct. 2005.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 103-114, jul. 1987.

JANG, J.J.; HO, H.V.; KWAN, H.H.; FAJARDO, L.F.; COOKE, J.P. Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, Hagerstown, v. 102, n. 12, p. 1414-1419, sep. 2000.

JENSEN, T.S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. *Eur. J. Pain*, London, v. 6, supl. A, p. 61-68, 2002.

JORTNER, B.S.; CHERRY, J.; LIDSKY, T.I.; MANETTO, C.; SHELL, L. Peripheral neuropathy of dietary riboflavin deficiency in chickens. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 544-555, sep. 1987.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, Basingstoke, v. 413, n. 6852, p. 203-210, sep. 2001.

KAYSER, V.; CHRISTENSEN, D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. *Pain*, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 53-60, oct. 2000.

KASAI, S.; NAKANO, H.; MAEDA, K.; MATSUI, K. Purification, properties, and function of flavokinase from rat intestinal mucosa. *J. Biochem.*, Tokyo, v. 107, n. 2, p. 298-303, feb. 1990.

KERSHAW, W.C.; IGA, T.; KLAASSEN, C.D. Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v. 106, n. 3, p. 448-455, dec. 1990.

KHAN, Z.P.; FERGUSON, C.N.; JONES, R.M. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia*, Oxford, v. 54, n. 2, p. 146-165, feb. 1999.

KIRKSEY, A.; MORRÉ, D.M.; WASYNCZUK, A.Z. Neuronal development in vitamin B₆ deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 585, p. 202-218, 1990.

KODAMA, K.; SUZUKI, M.; TOYOSAWA, T.; ARAKI, S. Inhibitory mechanisms of highly purified vitamin B₂ on the productions of proinflammatory cytokine and NO in endotoxin-induced shock in mice. *Life Sci.*, Oxford, v. 78, n. 2, p. 134-139, nov. 2005.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; MORI, K.; HATTORI, N.; ITO, H.; HIRAYAMA, M.; SOBUE, G. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency is identical to beriberi neuropathy. *Nutrition*, Burbank, v. 20, n. 11-12, p. 961-966, dec. 2004.

KONTNY, E.; ZIÓLKOWSKA, M.; RYZEWSKA, A.; MASLINSKI, W. Protein kinase C-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). *Cytokine*, San Diego, v. 11, n. 11, p. 839-848, nov. 1999.

KONTUREK, S.J.; PIASTUCKI, I.; BRZOZOWSKI, T.; RADECKI, T.; DEMBINSKA-KIEC, A.; ZMUDA, A.; GRYGLEWSKI, R. Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers. *Gastroenterology*, Philadelphia, v. 80, n. 1, p. 4-9, jan. 1981.

KUHLWEIN, A.; MEYER, H.J.; KOEHLER, C.O. Reduced diclofenac administration by B vitamins: results of a randomized double-blind study with reduced daily doses of diclofenac (75 mg diclofenac versus 75 mg diclofenac plus B vitamins) in acute lumbar vertebral syndromes. *Klin. Wochenschr.*, Berlin, v. 68, n. 2, p. 107-115, jan. 1990.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, Bethesda, v. 53, n. 4, p. 597- 652, dec. 2001.

LeMAY, L.G.; OTTERNESS, I.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. In vivo evidence that the rise in plasma IL 6 following injection of a fever-inducing dose of LPS is mediated by IL 1 β . *Cytokine*, San Diego, v. 2, n. 3, p. 199-204, may 1990.

LENG, S.; MIZUMURA, K.; KODA, H.; KUMAZAWA, H. Excitation and sensitization of the heat response induced by a phorbol ester in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 206, n. 1, p. 13-16, mar. 1996.

LESSER, H.; SHARMA, U.; LaMOREAUX, L.; POOLE, R.M. Pregabalin relieves symptoms of painful diabetic neuropathy. A randomized controlled trial. *Neurology*, Hagerstown, v. 63, n. 11, p. 2104-2110, dec. 2004.

LI, X.; EISENACH, J.C. α 2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 299, n. 3, p. 939-944, dec. 2001.

LINDENBAUM, J.; HEALTON, E.B.; SAVAGE, D.G.; BRUST, J.C.; GARRETT, T.J.; PODELL, E.R.; MARCELL, P.D.; STABLER, S.P.; ALLEN, R.H. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 318, n. 26, p. 1720-1728, jun. 1988.

LOH, H.H.; TSENG, L.F.; WEI, E.; LI, C.H. β -endorphin is a potent analgesic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 73, n. 8, p. 2895-2898, aug. 1976.

LONG, N.C.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S.L.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Roles of interleukin 1 β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 259, n. 4, p. r724-r728, oct. 1990.

MARCUS, R.; COULSTON, A.M. Water-soluble vitamins. The vitamin B complex and ascorbic acid. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.D. (Eds.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 63, p. 1753-1771.

MARTIN, P.R.; SINGLETON, C.K.; HILLER-STURMHÖFEL, S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res. Health*, Rockville, v. 27, n. 2, p. 134-142, 2003.

MAZARIO, J.; GAITAN, G.; HERRERO, J.F. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 40, n. 7, p. 937-946, jun. 2001.

McADAM, B.F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I.A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J.A.; FITZGERALD, G.A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 96, n.1, p. 272-277, jan. 1999.

McCLEANE, G.J. Intravenous infusion of phenytoin relieves neuropathic pain: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *Anesth. Analg.*, Baltimore, v. 89, n. 4, p. 985-988, oct. 1999.

McCORMICK, D.B. Metabolism of vitamins in microbes and mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, San Diego, v. 312, n. 1, p. 97-101, dec. 2003.

MEERT, T.F.; VERMEIRSCH, H.A. A preclinical comparison between different opioids: antinociceptive versus adverse effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Tarrytown, v. 80, n. 2, p. 309-326, feb. 2005.

MESDJIAN, E.; DeFEUDIS, F.V.; VALLI, M.; JADOT, G.; MANDEL, P. Antinociceptive action of sodium valproate in the mouse. *Gen. Pharmacol.*, Oxford, v. 14, n. 6, p. 697-699, 1983.

MINAMI, A.; TAKEDA, A.; NISHIBABA, D.; TAKEFUTA, S.; OKU, N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 894, n. 2, p. 336-339, mar. 2001.

MONTAGNA, P.; CORTELLI, P.; BARBIROLI, B. Magnetic resonance spectroscopy studies in migraine. *Cephalalgia*, Oxford, v. 14, n. 3, p. 184-193, jun. 1994.

MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C.D.; TIANO, H.F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J.C.; MAHLER, J.F.; KLUCKMAN, K.D.; LEDFORD, A.; LEE, C.A.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, Cambridge, v. 83, n. 3, p. 473-482, nov. 1995.

MUELLER, J.F.; VILTER, R.W. Pyridoxine deficiency in human beings induced with desoxypyridoxine. *J. Clin. Invest.*, v. 29, n. 2, p. 193-201, feb. 1950.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S.E.; TOPOL, E.J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, Chicago, v. 286, n. 8, p. 954-959, aug. 2001.

MURATA, T.; OMATA, N.; FUJIBAYASHI, Y.; WAKI, A.; SADATO, N.; YOSHIMOTO, M.; OMORI, M.; ISAKI, K.; YONEKURA, Y. Dynamic changes in glucose metabolism induced by thiamine deficiency and its replenishment as revealed by a positron autoradiography technique using rat living brain slices. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 29-36, mar. 1999.

NAPOLITANO, A.; SALVETTI, S.; VISTA, M.; LOMBARDI, V.; SICILIANO, G.; GIRALDI, C. Long-term treatment with idebenone and riboflavin in a patient with MELAS. *Neurol. Sci.*, Milano, v. 21, suppl. 3, p. S981-S982, dec. 2000.

NOVELLI, E.L.B.; VIEIRA, E.P.; RODRIGUES, N.L.; RIBAS, B.O. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ. Res.*, New York, v. 79, n. 2, p. 102-105, nov. 1998.

Osnes, L.T.; Foss, K.B.; Joo, G.B.; Okkenhaug, C.; Westvik, A.B.; Ovstebo, R.; Kierulf, P. Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb. Haemost.*, Stuttgart, v. 76, n. 6, p. 970-976, dec. 1996.

PINTO, J.; HUANG, Y.P.; RIVLIN, R.S. Inhibition of riboflavin metabolism in rat tissues by chlorpromazine, imipramine, and amitriptyline. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v. 67, n. 5, p. 1500-1506, may 1981.

PINTO, J.; RAICZYK, G.B.; HUANG, Y.P.; RIVLIN, R.S. New approaches to the possible prevention of side effects of chemotherapy by nutrition. *Cancer*, Hoboken, v. 58, suppl. 8, p. 1911-1914, oct. 1986.

POWERS, H.J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 77, n. 6, p. 1352-1360, jun. 2003.

PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 345-355, feb. 1995.

RASKIN, P.; DONOFRIO, P.D.; ROSENTHAL, N.R.; HEWITT, D.J.; JORDAN, D.M.; XIANG, J.; VINIK, A.I. Topiramate vs placebo in painful diabetic neuropathy. Analgesic and metabolic effects. *Neurology*, Hagerstown, v. 63, n. 5, p. 865-873, sep. 2004.

REYES-GARCÍA, G.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; TERÁN-ROSALES, F.; MATEOS-GARCÍA, E.; CASTILLO-HENKEL, C. Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, New York, v. 42, n. 2, p. 73-77, oct. 1999.

RIVLIN, R.S. Hormones, drugs and riboflavin. *Nutr. Rev.*, Washington, v. 37, n. 8, p. 241-246, aug. 1979.

ROBERTS II, L.J.; MORROW, J.D. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.D. (Eds.). *Goodman & Gilman's the*

pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 27, p. 687-731.

RODRIGUES, A.L.; ROCHA, J.B.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v. 79, n. 3, p. 150-156, sep. 1996.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Modification of the antinociceptive effect of morphine by acute and chronic administration of clomipramine in mice. *Pain*, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 349-355, jun. 1988.

ROWBOTHAM, M.; HARDEN, N.; STACEY, B.; BERNSTEIN, P.; MAGNUS-MILLER, L. Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *JAMA*, Chicago, v. 280, n. 21, p. 1837-1842, dec. 1998.

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. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 118, n. 4, p. 829-838, jun. 1996.

SANCHÉZ de MIGUEL, L.; de FRUTOS, T.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, F.; del POZO, V.; LAHOZ, C.; JIMÉNEZ, A.; RICO, L.; GARCÍA, R.; ACEITUNO, E.; MILLÁS, I.; GÓMEZ, J.; FARRÉ, J.; CASADO, S.; LÓPEZ-FARRÉ, A. Aspirin inhibits inducible nitric oxide synthase expression and tumor necrosis factor- α release by cultured smooth muscle cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, Berlin, v. 29, n. 2, p. 93-99, feb. 1999.

SÁNDOR, P.S.; ÁFRA, J.; AMBROSINI, A.; SCHOENEN, J. Prophylactic treatment of migraine with β -blockers and riboflavin: differential effects on the intensity dependence of auditory evoked cortical potentials. *Headache*, Mount Royal, v. 40, n. 1, p. 30-35, jan. 2000.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; de FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 47, n. 7, p. 302-307, jul. 1998.

SATOH, M.; MINAMI, M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 68, n. 3, p. 343-364, apr. 1995.

SCAPINI, P.; MORINI, M.; TECCHIO, C.; MINGHELLI, S.; di CARLO, E.; TANGHETTI, E.; ALBINI, A.; LOWELL, C.; BERTON, G.; NOONAN, D.M.; CASSATELLA, M.A. CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 172, n. 8, p. 5034-5040, apr. 2004.

SCHAEFFER, M.C. Attenuation of acoustic and tactile startle responses of vitamin B-6 deficient rats. *Physiol. Behav.*, New York, v. 40, n. 4, p. 473-478, 1987.

SCHEPELMANN, K.; MEBLINGER, K.; SCHMIDT, R.F. The effects of phorbol ester on slowly conducting afferents of the cat's knee joint. *Exp. Brain Res.*, Berlin, v. 92, n. 3, p. 391-398, 1993.

SCHOENEN, J.; JACQUY, J.; LENAERTS, M. Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial. *Neurology*, Hagerstown, v. 50, n. 2, p. 466-470, feb. 1998.

SEEKAMP, A.; HULTQUIST, D.B.; TILL, G.O. Protection by vitamin B₂ against oxidant-mediated acute lung injury. *Inflammation*, New York, v. 23, n. 5, p. 449-460, oct. 1999.

SEGUIN, L.; Le MAROUILLE-GIRARDON, S.; MILLAN, M.J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin₁ and neurokinin₂ receptor antagonists: a comparison to other classes of antinociceptive agents. *Pain*, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 325-343, may 1995.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, dec. 1994.

SIMPSON, D.M.; OLNEY, R.; McARTHUR, J.C.; KHAN, A.; GODBOLD, J.; EBEL-FROMMER, K. A placebo-controlled trial of lamotrigine for painful HIV-associated neuropathy. *Neurology*, Hagerstown, v. 54, n. 11, p. 2115-2119, jun. 2000.

SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. Pharmacologic treatment of pain in polyneuropathy. *Neurology*, Hagerstown, v. 55, n. 7, p. 915-920, oct. 2000.

SOUZA, A.L.S.; MOREIRA, F.A.; ALMEIDA, K.R.; BERTOLLO, C.M.; COSTA, K.A.; COELHO, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 135, n. 1, p. 239-247, jan. 2002.

SUZUKI, R.; EDWARDS, M.; DICKENSON, A.H. ReN-1869 [(R)-1-(3-(10, 11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5-ylidene)-1-propyl)-3-piperidine carboxylic acid], a novel histamine H₁ receptor antagonist, produces potent and selective antinociceptive effects on dorsal horn neurons after inflammation and neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v. 309, n. 3, p. 1230-1238, jun. 2004.

SUZUKI, Y.; TANIHARA, M.; NAKAGAWA, M.; FURUKAWA, A.; MASUDA, C.; TERASAWA, K.; ICHIKAWA, Y.; MIZUSHIMA, Y. An interleukin-1 binding region oligopeptide from the human type I IL-1 receptor reduces acute inflammation, delayed hypersensitivity reaction, and lethal endotoxemia in animals. *J. Interferon Cytokine Res.*, Larchmont, v. 15, n. 12, p. 1083-1088, dec. 1995.

SWINGLE, K.F.; SHIDEMAN, F.E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v. 183, n. 1, p. 226-234, oct. 1972.

TANAKA, J.; NAGAI, T.; ARAI, H.; INUI, K.; YAMANOUCHI, H.; GOTO, Y.; NONAKA, I.; OKADA, S. Treatment of mitochondrial encephalomyopathy with a combination of cytochrome C and vitamins B₁ and B₂. *Brain Dev.*, Tokyo, v. 19, n. 4, p. 262-267, jun. 1997a.

TANAKA, S.; OSARI, S.; OZAWA, M.; YAMANOUCHI, H.; GOTO, Y.; MATSUDA, H.; NONAKA, I. Recurrent pain attacks in a 3-year-old patient with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF): a single-photon emission computed tomographic (SPECT) and electrophysiological study. *Brain Dev.*, Tokyo, v. 19, n. 3, p. 205-208, apr. 1997b.

TANAKA, T.; MINAMI, M.; NAKAGAWA, T.; SATOH, M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci. Res.*, Shannon, v. 48, n. 4, p. 463-469, apr. 2004.

TANELIAN, D.L.; BROSE, W.G. Neuropathic pain can be relieved by drugs that are use-dependent sodium channel blockers: lidocaine, carbamazepine, and mexiletine. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 74, n. 5, p. 949-951, may 1991.

TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 5-17, oct. 1992.

TOYOSAWA, T.; SUZUKI, M.; KODAMA, K.; ARAKI, S. Highly purified vitamin B₂ presents a promising therapeutic strategy for sepsis and septic shock. *Infect. Immun.*, Washington, v. 72, n. 3, p. 1820-1823, mar. 2004.

TRACEY, W.R.; NAKANE, M.; KUK, J.; BUDZIK, G.; KLINGHOFER, V.; HARRIS, R.; CARTER, G. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NG-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 273, n. 3, p. 1295-1299, jun. 1995.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.*, London, v. 231, n. 25, p. 232-235, jun. 1971.

VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 278, n. 1, p. 304-312, jul. 1996.

VERDRENGH, M.; TARKOWSKI, A. Riboflavin in innate and acquired immune responses. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 54, n. 9, p. 390-393, sep. 2005.

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

WALLACE, J.L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 126, n. 5, p. 1200-1204, mar. 1999.

WANG, G.K.; QUAN, C.; VLADIMIROV, M.; MORK, W.M.; THALHAMMER, J.G. Quaternary ammonium derivative of lidocaine as a long-acting local anesthetic. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 83, n. 6, p. 1293-1301, dec. 1995.

WANG, H.Q.; KIM, M.P.; TIANO, H.F.; LANGENBACH, R.; SMART, R.C. Protein kinase C- α coordinately regulates cytosolic phospholipase A₂ activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 59, n. 4, p. 860-866, apr. 2001.

WANG, Z-B.; GAN, Q.; RUPERT, R.L.; ZENG, Y-M.; SONG, X-J. Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain*, Amsterdam, v. 114, n. 1-2, p. 266-277, mar. 2005.

WEBER, C.; ERL, W.; PIETSCH, A.; WEBER, P.C. Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation*, Hagerstown, v. 91, n. 7, p. 1914-1917, apr. 1995.

WILLIAMS, D.G.; DICKENSON, A.; FITZGERALD, M.; HOWARD, R.F. Developmental regulation of codeine analgesia in the rat. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 100, n. 1, p. 92-97, jan. 2004.

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

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 80, p. 300-307, 1944.

YANG, L.C.; MARSALA, M.; YAKSH, T.L. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE₂ release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. *Pain*, Amsterdam, v. 67, n. 2-3, p. 345-354, oct. 1996.

ZIMMERMANN, K.C.; SARBIA, M.; SCHRÖR, K.; WEBER, A-A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol. Pharmacol.*, Bethesda, v. 54, n. 3, p. 536-540, sep. 1998.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, Amsterdam, v.16, n. 2, p.109-110, jun. 1983.

ZIMMERMANN, M.; BARTOSZYK, G.D.; BONKE, D.; JURNA, I.; WILD, A. Antinociceptive properties of pyridoxine. Neurophysiological and behavioral findings. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 585, p. 219-230, 1990.