

**KARINA ABDO COSTA**

**ALODÍNIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA  
INDUZIDOS POR UM ATIVADOR DA PROTEÍNA  
QUINASE C, PDD: CARACTERIZAÇÃO E  
COMPARAÇÃO COM AS RESPOSTAS  
INDUZIDAS PELA CARRAGENINA**

**Belo Horizonte  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
2004**

**KARINA ABDO COSTA**

**ALODÍNIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA  
INDUZIDOS POR UM ATIVADOR DA PROTEÍNA  
QUINASE C, PDD: CARACTERIZAÇÃO E  
COMPARAÇÃO COM AS RESPOSTAS  
INDUZIDAS PELA CARRAGENINA**

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 de Matos Coelho

**Belo Horizonte  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
2004**

C837a Costa, Karina Abdo.  
Alodinia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina / Karina Abdo Costa. – Belo Horizonte, MG : [s.n], 2004.  
113f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Edema – Teses. 2. Neurofisiologia - Teses. 3. Neuroquímica – Teses. 4. Proteínas – Teses. I. Coelho, Márcio de Matos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD:612.8042

*O que escrevo nasce do meu próprio amadurecimento, um trajeto de altos e baixos, pontos luminosos e zonas de sombra. Nesse curso entendi que a vida não tece apenas uma teia de perdas, mas nos proporciona uma sucessão de ganhos.*

*O equilíbrio da balança depende muito do que soubermos e quisermos enxergar.*

*Lya Luft*

*Ao meu pai, Marcos José Costa, por ter acreditado, por ter sido um grande incentivador e, principalmente, por ter sido um grande amigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho pela orientação e por me ajudar a enxergar sempre o lado positivo dos acontecimentos. A sua postura profissional e o amor pela pesquisa e pelo ensino são um grande exemplo e incentivo para mim.

Aos amigos do laboratório Adriano, Fabrício, Elias, Caryne, Leonardo, Antônio Carlos, Kellen e Flávia pela ajuda na realização do estudo e pela amizade e carinho.

À médica veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao funcionário do biotério, José Batista Viturino, pela paciência, pela amizade e por realizarem um trabalho responsável, fundamental para a pesquisa.

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

A minha mãe e aos meus irmãos, Marcos e André, que sempre apoiaram minhas decisões, mesmo que elas resultassem em distância. Agradeço-lhes, também, por me ajudarem a superar os momentos difíceis.

Ao Magno, pelo amor. Sua incansável ajuda e seu incentivo constante foram importantíssimos.

À família Brandão Ribeiro, por abrirem as portas e me acolherem como uma filha.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A ativação da proteína quinase C (PKC) *in vitro* induz a liberação de mediadores inflamatórios e ativa ou sensibiliza os nociceptores. Estudos *in vivo* demonstraram que a ativação da PKC induz resposta inflamatória e está relacionada com o processamento espinhal e periférico da resposta nociceptiva. No entanto, uma caracterização da resposta nociceptiva e do edema induzidos pela injeção intraplantar (i.pl.) de um ativador da PKC em ratos ainda não foi conduzida. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a alodínia mecânica e o edema induzidos pela injeção i.pl. de um ativador da PKC em ratos, avaliar o papel de diferentes mediadores (eicosanóides, 5-HT, histamina e NO) no desenvolvimento dessas respostas e comparar os resultados obtidos com aqueles induzidos pela carragenina. A injeção i.pl. do forbol-12,13-didecanoato (PDD; 0,01 ou 0,1 µg), um ativador da PKC, ou da carragenina (50 ou 500 µg), mas não do 4α-PDD (análogo inativo), induziu alodínia mecânica e edema. A alodínia mecânica induzida pelo PDD foi parcialmente inibida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de indometacina (2 ou 4 mg/Kg), L-NAME (100 mg/Kg) ou a associação indometacina e L-NAME, mas não de dexametasona (0,25 ou 1 mg/Kg), rofecoxib (5 ou 10 mg/Kg), metisergida (2 ou 4 mg/Kg), prometazina (5 ou 10 mg/Kg) ou morfina (5 ou 10 mg/Kg). Por outro lado, a alodínia mecânica induzida pela carragenina foi inibida pela injeção i.p. de indometacina (2 ou 4 mg/kg), rofecoxib (5 ou 10 mg/Kg), L-NAME (100 mg/Kg), metisergida (4 mg/Kg) ou morfina (5 ou 10 mg/Kg). O edema induzido pelo PDD foi inibido pela injeção i.p. de dexametasona (0,25 ou 1 mg/Kg), L-NAME (50 ou 100 mg/Kg), metisergida (2 ou 4 mg/Kg), prometazina (5 ou 10 mg/Kg) ou cetotifeno (4 mg/Kg), mas não de indometacina (2 ou 4 mg/Kg). O edema induzido pela carragenina foi inibido pela injeção i.p. de dexametasona (0,25 ou 1 mg/Kg), indometacina (2 ou 4 mg/Kg), rofecoxib (5 ou 10 mg/Kg), L-NAME (50 ou 100 mg/Kg), metisergida (2 ou 4 mg/Kg), mas não de prometazina (5 ou 10 mg/Kg). Por último, a injeção i.pl. de indometacina (50 ou 100 µg) ou L-NAME (50 ou 100 µg) não inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Concluindo, a injeção i.pl. de um ativador da PKC induz alodínia mecânica e edema, respostas que provavelmente resultam da ação de diferentes mediadores. Além disso, essas respostas diferem daquelas induzidas pela carragenina, uma vez que as drogas investigadas influenciam de forma diferente as respostas induzidas pelos dois estímulos inflamatórios.

**PALAVRAS CHAVES:** proteína quinase C, nocicepção, alodínia, edema, éster de forbol, PDD, carragenina, mediadores inflamatórios.

## SUMMARY

*In vitro* protein kinase C (PKC) activation releases inflammatory mediators and activates or sensitizes nociceptors. *In vivo* studies have demonstrated that PKC activation induces inflammation and is associated with the peripheral and spinal processing of the nociceptive response. However, a full characterization of the nociceptive response and edema induced by intraplantar (i.pl.) injection of a PKC activator has not been carried out. The present study aimed to characterize the mechanical allodynia and edema induced by i.pl. injection of a PKC activator in rats, to evaluate the role of different mediators (eicosanoids, 5-HT, histamine and NO) in the development of these responses and to compare the results with those induced by carrageenan. I.pl. injection of phorbol-12,13-didecanoate (PDD: 0.01 or 0.1 µg), a PKC activator, or carrageenan (50 or 500 µg), but not 4α-PDD, an inactive analogue, induced mechanical allodynia and edema. The mechanical allodynia induced by PDD was partially inhibited by intraperitoneal (i.p.) injection of indomethacin (2 or 4 mg/Kg), L-NAME (100 mg/Kg) and the association indomethacin + L-NAME, but not dexamethasone (0.25 or 1 mg/Kg), rofecoxib (5 or 10 mg/Kg), methysergide (2 or 4 mg/Kg), promethazine (5 or 10 mg/Kg) or morphine (5 or 10 mg/Kg). The mechanical allodynia induced by carrageenan was inhibited by i.p. injection of indomethacin (2 or 4 mg/kg), rofecoxib (5 or 10 mg/Kg), L-NAME (100 mg/Kg), methysergide (4 mg/Kg) or morphine (5 or 10 mg/Kg). The edema induced by PDD was inhibited by i.p. injection of dexamethasone (0.25 or 1 mg/Kg), L-NAME (50 or 100 mg/Kg), methysergide (2 or 4 mg/Kg), promethazine (5 or 10 mg/Kg) or ketotifen (4 mg/Kg), but not indomethacin (2 or 4 mg/Kg). The edema induced by carrageenan was inhibited by the i.p. injection of dexamethasone (0.25 or 1 mg/Kg), indomethacin (2 or 4 mg/Kg), rofecoxib (5 or 10 mg/Kg), L-NAME (50 or 100 mg/Kg), methysergide (2 or 4 mg/Kg), but not promethazine (5 or 10 mg/Kg). Finally, i.pl. injection of indomethacin (50 or 100 µg) or L-NAME (50 or 100 µg) did not inhibit the mechanical allodynia induced by PDD. In conclusion, i.pl. injection of a PKC activator induces mechanical allodynia and edema, responses that probably result from the action of different mediators. In addition, these responses differ from those induced by carrageenan, since the drugs used affected differentially the responses induced by the two inflammatory stimuli.

**KEY WORDS:** protein kinase C, nociception, allodynia, edema, phorbol ester, PDD, carrageenan, inflammatory mediators.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representações esquemáticas das estruturas primárias das isoformas da PKC.....	29
Figura 2	Estruturas do DAG e de alguns ésteres de forbol.....	30
Figura 3	Regulação das vias de sinalização pelas isoformas da PKC sensíveis ao DAG e aos ésteres de forbol.....	32
Figura 4	Avaliação da alodínia mecânica por meio do uso de filamento de nylon.....	40
Figura 5	Avaliação do edema de pata por meio do uso do plestismômetro.....	41
Figura 6	Efeito do PDD sobre a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica.....	47
Figura 7	Efeito do 4 $\alpha$ -PDD sobre a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica.....	48
Figura 8	Efeito da carragenina sobre a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica.....	49
Figura 9	Efeito do PDD sobre o volume de pata.....	50
Figura 10	Efeito do 4 $\alpha$ -PDD sobre o volume de pata.....	51
Figura 11	Efeito da carragenina sobre o volume de pata.....	52
Figura 12	Efeito da dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina.....	54
Figura 13	Efeito da dexametasona sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	55
Figura 14	Efeito da indometacina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina.....	57
Figura 15	Efeito da indometacina sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	58
Figura 16	Efeito do rofecoxib sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina.....	59
Figura 17	Efeito do rofecoxib sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	60
Figura 18	Efeito do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou	

	pela carragenina.....	62
Figura 19	Efeito do L-NAME sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	63
Figura 20	Efeito da indometacina + L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.....	64
Figura 21	Efeito da metisergida sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina.....	67
Figura 22	Efeito da metisergida sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	68
Figura 23	Efeito prometazina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.....	69
Figura 24	Efeito da prometazina sobre a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica .....	70
Figura 25	Efeito da prometazina sobre o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina.....	71
Figura 26	Efeito do cetotifeno sobre o edema de pata induzido pelo PDD.....	72
Figura 27	Efeito da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina.....	74
Figura 28	Efeito da morfina sobre a resposta nociceptiva no modelo da placa quente em camundongos.....	75
Figura 29	Efeito da injeção i.pl. da indometacina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.....	77
Figura 30	Efeito da injeção i.pl. do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ATP	Trifosfato de adenosina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
5-HT	Serotonina
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDRF	Fator relaxante derivado de endotélio
GRD	Gânglio da raiz dorsal
IASP	International Association for the Study of Pain
IL	Interleucina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
L-NOARG	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
NGF	Fator de crescimento de nervo
NMDA	Ácido-N-metil-D-aspártico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PDD	Forbol-12,13-didecanoato
PG	Prostaglandina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PMA ou TPA	Forbol-12-miristato-13-acetato

OS	Fosfatidilserina
s.c.	Subcutânea
SP	Substância P
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TX	Tromboxano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
2.1	<i>Objetivo geral</i> .....	36
2.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	36
2.3	<i>Justificativa</i> .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1	<i>Animais</i> .....	38
3.2	<i>Drogas</i> .....	38
3.3	<i>Avaliação da alodínia mecânica em ratos</i> .....	40
3.4	<i>Avaliação do edema de pata em ratos</i> .....	41
3.5	<i>Avaliação da resposta nociceptiva no modelo da placa quente em camundongos</i> .....	42
3.6	<i>Análise estatística</i> .....	42
3.7	<i>Protocolos experimentais</i> .....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	46
4.1	<i>Alodínia mecânica e edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina</i> .....	46
4.2	<i>Efeito da dexametasona sobre a alodínia mecânica e o edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina</i> .....	53
4.3	<i>Efeito da indometacina ou do rofecoxib sobre a alodínia mecânica e o edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina</i> .....	56
4.4	<i>Efeito do L-NAME sobre a alodínia mecânica e o edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina</i> .....	61
4.5	<i>Efeito da metisergida ou prometazina sobre a alodínia mecânica e o edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina</i> .....	65
4.6	<i>Efeito da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD</i>	

<i>ou pela carragenina.....</i>	73
4.7 <i>Efeito da injeção i.pl. da indometacina ou do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.....</i>	76
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	80
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	93

# 1 INTRODUÇÃO

Vários estímulos exógenos e endógenos podem causar lesão celular, o que desencadeia uma reação complexa chamada inflamação. Embora os sinais da inflamação tenham sido descritos em um papiro egípcio (3000 a.C.), Celsus, escritor romano do primeiro século d.C., foi o primeiro a citar os quatro sinais e sintomas da inflamação: eritema, edema, calor e dor. Outro aspecto da inflamação, perda da função, foi posteriormente acrescentado por Virchow. Em 1793, o cirurgião escocês John Hunter constatou o que hoje é considerado óbvio: a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que, na maioria das vezes, é importante para a recuperação da função tecidual (APPLETON *et al.*, 1996; COLLINS, 1999).

Atualmente, a inflamação é reconhecida como um processo bioquímico e celular que acontece no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, as células circulantes, os vasos e os constituintes celulares e extracelulares desse tecido. Esse processo tem como objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo e, também, induzir uma série de eventos que contribuem para a cicatrização e reconstituição do tecido lesado. Em resumo, a inflamação é, na maioria das vezes, uma resposta protetora cuja função é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das conseqüências dessa lesão (COLLINS, 1999; ROTE, 1998).

A inflamação pode se manifestar como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, de minutos, horas, a alguns dias, e suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), migração celular e sensibilização ou ativação dos nociceptores. Essa resposta pode ser causada por trauma mecânico, privação de oxigênio ou nutrientes, alterações imunológicas ou genéticas, agentes químicos, microorganismos, temperaturas extremas ou radiação. Por outro lado, a inflamação crônica é de longa duração e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sangüíneos, fibrose e necrose tecidual (ROTE, 1998; RYAN & MAJNO, 1977; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

As descobertas das alterações associadas à resposta inflamatória, dos mediadores envolvidos no estabelecimento dessas alterações, bem como das drogas com atividade antiinflamatória têm sido possíveis em função da existência de vários modelos experimentais. Esses modelos podem diferir entre si quanto às células e aos mediadores envolvidos, alterações observadas, duração e magnitude das alterações e recuperação da função tecidual. Diferentes substâncias de natureza exógena ou endógena podem ser usadas para induzir inflamação aguda ou crônica em animais experimentais.

O modelo de inflamação induzida pela carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales, tornou-se o mais usado e permitiu a determinação do papel de vários mediadores importantes, bem como a identificação de drogas potencialmente antiinflamatórias. Esse modelo foi originalmente proposto por Winter *et al.* (1962) para a indução do edema de pata em ratos. Posteriormente, Levy (1969) demonstrou que a carragenina também causa edema de pata em camundongos. A carragenina também induz sensibilização dos nociceptores para estímulos mecânicos (CAMPOS *et al.*, 1999; KAYSER & GUILBAUD, 1987; VINEGAR *et al.*, 1987) e térmicos (OSBORNE & CODERRE, 1999; SMITH *et al.*; 1998; ZHANG *et al.*, 1997) e migração celular (ALMEIDA *et al.*, 1980; HIGGS *et al.*, 1980; PINHEIRO & CALIXTO, 2002; VINEGAR *et al.*, 1987), entre outras manifestações da resposta inflamatória.

Outros estímulos inflamatórios que também induzem edema e sensibilização dos nociceptores têm sido usados. Entre esses, podem ser mencionados o formaldeído (DAMAS & LIÉGEOIS, 1999; DUBUISSON & DENNIS, 1977; FRANÇA *et al.*, 2001; Le BARS *et al.*, 2001; TJØLSEN *et al.*, 1992), o adjuvante completo de Freund (CHILLINGWORTH & DONALDSON, 2003; HAY & de BELLEROCHE, 1998), a dextrana (LO *et al.*, 1982), o caolin (CAMPOS *et al.*, 1999; WHEELER-ACETO *et al.*, 1990), leveduras (WHEELER-ACETO *et al.*, 1990) e o lipopolissacarídeo (LPS) (FERREIRA *et al.*, 1993; KANAAN *et al.*, 1996).

Apesar da existência de diferentes modelos de inflamação, acredita-se que as alterações que contribuem para o desenvolvimento dos sinais observados sejam semelhantes. O aumento do calibre vascular e do fluxo sanguíneo, alterações que



contribuem para o eritema e o calor, iniciam-se logo após a administração do estímulo inflamatório e desenvolvem-se em velocidade variável, de acordo com a dose usada, o tecido onde foi feita a administração e a espécie animal, entre outros fatores. Diferentes mediadores inflamatórios contribuem para o desenvolvimento dessas alterações, bem como para aumento da permeabilidade dos capilares e das vênulas, o que resulta em extravasamento de um líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício. A perda de proteínas do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e eleva a pressão osmótica do líquido intersticial. Essas alterações, associadas à pressão hidrostática elevada induzida pela vasodilatação, resultam em efluxo acentuado de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, o que é denominado edema. A função dessas alterações é permitir o aporte de fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio da lesão. Tradicionalmente, o edema é avaliado de forma direta, por meio da determinação do volume ou da espessura da pata, ou de forma indireta, por meio da determinação do extravasamento de corantes ou substâncias marcadas com elementos radioativos no local onde foi injetado o estímulo inflamatório (COLLINS, 1999; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Embora os modelos mencionados permitam investigar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do edema associado à inflamação, bem como as drogas que possam inibi-lo, a sensibilização e a ativação dos nociceptores representam respostas de maior interesse, uma vez que constituem as bases neurofisiológicas da maioria das experiências dolorosas. O maior interesse em investigar esses aspectos está diretamente associado ao reconhecimento de que a dor representa o sintoma associado a várias doenças, principalmente aquelas de origem inflamatória ou degenerativa, que mais causa sofrimento aos pacientes.

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos e está associada a uma lesão real ou potencial. Quanto ao aspecto sensorial, a dor pode ser dividida em quatro modalidades principais: dor nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática e dor funcional (SCHOLZ & WOOLF, 2002; WOOLF, 2004). A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores por estímulos mecânicos, térmicos e químicos supralimiais e tem importante papel adaptativo, conferindo

proteção aos organismos que a apresentam. Como exemplo, pode ser mencionado o relato de dor após a perfuração da pele por uma agulha. A dor inflamatória está associada à lesão tecidual e conseqüente produção de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores. Na maioria das vezes, essas alterações fenotípicas dos nociceptores contribuem para o desenvolvimento de um comportamento de esquiva e, assim, facilitam a recuperação do tecido lesado. Como exemplo de dor inflamatória, pode ser mencionada aquela associada à inflamação causada por um procedimento cirúrgico. A dor neuropática é uma modalidade caracterizada por dor espontânea e intensa sem funções protetoras ou reparadoras aparentes e que resulta de lesões do sistema nervoso periférico ou central. Um exemplo característico de dor neuropática é aquela que pode ser relatada por pacientes que tiveram algum membro amputado. A última modalidade, dor funcional, representa um conceito em evolução e é menos compreendida. Essa modalidade não está associada a qualquer anormalidade periférica ou disfunção neurológica aparente e pode ser exemplificada pela cefaléia tensional.

O aspecto da dor mais freqüentemente avaliado nos modelos experimentais é o sensorial e, portanto, usa-se o termo nocicepção ou resposta nociceptiva para se referir à habilidade para detectar e reagir a estímulos nocivos. Outros termos amplamente usados em estudos clínicos e experimentais para se referir à sensibilização dos nociceptores durante o processo inflamatório são hiperalgesia e alodínia. De acordo com a IASP, hiperalgesia é uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso, enquanto alodínia é a dor induzida por um estímulo que normalmente não provoca dor. Uma adaptação dessas definições para os modelos experimentais permitiria afirmar que a hiperalgesia representa uma resposta nociceptiva aumentada a estímulos originalmente nocivos, enquanto a alodínia é caracterizada pela resposta nociceptiva induzida por estímulos originalmente inócuos.

De uma forma geral, a resposta nociceptiva se inicia com a ativação de um grupo especial de neurônios sensoriais por estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos. Esses neurônios, também chamados nociceptores, conduzem informações para centros localizados na medula espinhal ou no cérebro. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD),

nodosos ou trigeminais, dependendo da parte do corpo que inervam. Os nociceptores diferem de outros grupos de neurônios sensoriais, principalmente, em relação ao limiar para ativação. Em situações normais, nas quais não há processo inflamatório associado, os nociceptores apresentam limiar de ativação bem mais elevado do que aquele dos demais neurônios sensoriais. Durante o processo inflamatório pode ocorrer diminuição do limiar para ativação dos nociceptores e o desenvolvimento de alodínia ou hiperalgesia. Para revisões sobre o assunto, veja CATERINA & JULIUS (2001), LEWIN *et al.* (2004), MILLAN (1999), RAJA *et al.* (1999) e SNIDER & McMAHON (1998).

Os nociceptores podem ser classificados quanto ao diâmetro de seus axônios, mielinização e velocidade de condução do potencial de ação. Os nociceptores denominados tradicionalmente como fibras C apresentam axônios de pequeno diâmetro, não mielinizados e conduzem em menor velocidade o potencial de ação, enquanto aqueles denominados fibras A $\delta$  apresentam axônios de maior diâmetro, mielinizados e maior velocidade de condução (JULIUS & BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999). Quanto aos peptídeos produzidos e liberados, as fibras C podem ser classificadas em duas populações. Uma população contém peptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e é regulada pelo fator de crescimento de nervo (NGF). A outra população, não peptidérgica, pode ser identificada por meio de métodos imunohistoquímicos pela presença de enzimas específicas. Essas duas populações apresentam, também, diferenças nas projeções para o corno dorsal da medula espinhal. Apesar disso, acredita-se que não existem diferenças marcantes em relação aos tipos de estímulos que as ativam (SNIDER & McMAHON, 1998). Os nociceptores também podem ser classificados quanto ao aspecto funcional como sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos, químicos ou de caráter polimodal. Apesar de todas as combinações de sensibilidade serem encontradas, os nociceptores polimodais, que respondem a todos os tipos de estímulos, são os mais comuns (HUNT & MANTYH, 2001).

Em relação aos estímulos térmicos, especialmente os estímulos térmicos nocivos, há um amplo conhecimento das bases neurofisiológicas e moleculares associadas a sua detecção. Aproximadamente 45% dos nociceptores exibem correntes de

membrana ativadas por temperaturas moderadas de aproximadamente 45 °C, enquanto 5 a 10% dessas são ativadas por temperaturas superiores a 52 °C (KIRSCHSTEIN *et al.*, 1999; NAGY & RANG, 1999). Maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta nociceptiva induzida pelo calor ocorreu recentemente com a descoberta de um canal iônico que é ativado por temperaturas iguais ou superiores a 43 °C (CATERINA *et al.*, 1997) e, posteriormente, de outro canal iônico semelhante ativado por temperaturas iguais ou superiores a 51 °C (CATERINA *et al.*, 1999).

O canal iônico ativado por temperaturas iguais ou superiores a 43 °C, denominado receptor TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*), é um canal de cátions, não seletivo, ativado por capsaicina e outros compostos vanilóides, prótons e calor (CATERINA *et al.*, 1997; CLAPHAM, 2003). Por outro lado, os receptores TRPV2 são ativados por temperaturas mais elevadas (> 52 °C), sendo importantes para a transdução de calor nocivo. Estudos recentes demonstraram a existência de vários receptores TRP que são ativados por faixas de temperaturas específicas, como os receptores TRPV3 e TRPV4, ativados por temperaturas superiores a 31 e 25 °C, respectivamente (CATERINA & JULIUS, 2001; CLAPHAM, 2003; TOMINAGA & CATERINA, 2004).

Embora menos estudada, a sensibilidade ao frio também parece depender de receptores da família TRP. McKemy *et al.* (2002) e Peier *et al.* (2002) identificaram um canal iônico que é ativado por baixas temperaturas (< 15 °C) e pelo mentol. Esse canal foi denominado CMR1 (*cold-menthol receptor type1*) ou TRPM8. Recentemente, outros canais da família TRP que são ativados por temperaturas inferiores extremas foram identificados em fibras aferentes primárias nociceptivas (WOOD, 2004). Essas descobertas podem tornar mais claro o entendimento de como temperaturas reduzidas podem causar dor.

Como mencionado, vários estudos recentes têm proporcionado um grande avanço do conhecimento sobre as bases neurofisiológicas e moleculares associadas à sensibilidade aos estímulos térmicos. Entretanto, a compreensão das bases neurofisiológicas e moleculares associadas à sensibilidade aos estímulos mecânicos ainda é reduzida. Tem sido proposto que a ativação de neurônios sensíveis aos

estímulos mecânicos resulta da abertura ou do fechamento de canais iônicos. Entre os canais sensíveis à estimulação mecânica, definidos por estudos genéticos em *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, muitos pertencem à família dos canais de sódio epiteliais (ENaC) / degenerina (DEG) (WOOD, 2004). Price *et al.* (2000) demonstraram que um canal iônico, conhecido como canal de sódio cerebral 1 (BNC1) (também denominado MDEG, BNaC1 ou ASIC2), pertencente à família de canais ENaC/DEG em mamíferos, é essencial para detecção de toques leves. Entretanto, o papel desses canais iônicos na detecção de estímulos mecânicos nocivos ainda não foi esclarecido.

Por outro lado, Cho *et al.* (2002) identificaram dois canais de cátions em cultura de neurônios sensoriais que são ativados por estímulos mecânicos. Esses canais diferem de outros já identificados em suas propriedades biofísicas como condutância, seletividade iônica, relação corrente-voltagem e sensibilidade à pressão. Os canais iônicos identificados são ativados por estímulos de baixo limiar (LT) ou estímulos de alto limiar (HT). Há evidências de que os canais HT estão relacionados com a sensibilidade aos estímulos mecânicos nocivos. Os canais HT são encontrados em neurônios de pequeno diâmetro, o que indica seu possível papel na ativação dos nociceptores por estímulos mecânicos nocivos. Além do mais, prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> diminui o limiar de ativação dos canais HT, o que pode explicar o desenvolvimento da hiperalgesia ou alodínia a estímulos mecânicos durante o processo inflamatório.

Estudos recentes indicaram que os canais iônicos da família TRP também podem estar relacionados com a sensibilidade aos estímulos mecânicos. Foi demonstrado que o canal TRPV4, um canal ativado por estiramento e calor, é necessário para transdução de estímulos mecânicos nocivos. No entanto, o papel exato desse canal na transdução desses estímulos não está totalmente claro, sendo provável que a sua percepção deve envolver uma variedade de canais iônicos que, juntos, contribuem para a sensação de pressão ou dor (WOOD, 2004; COREY, 2003).

Além da sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos, os nociceptores podem ser ativados ou ter seu limiar para ativação reduzido na presença de vários mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório. Como resultado

dessas alterações, pode ocorrer comportamento nociceptivo espontâneo, hiperalgesia ou alodínia. Parte dos nociceptores sensíveis aos estímulos químicos normalmente é insensível aos estímulos térmicos e mecânicos. Esses nociceptores, chamados de silenciosos, são ativados apenas durante condições que induzem alterações marcantes do microambiente químico local, como aquelas associadas ao processo inflamatório (HUNT & MANTYH, 2001; XU *et al.*, 2000). Os mediadores inflamatórios também contribuem para as alterações vasculares que resultam no edema. Tais mediadores, atuando de maneira isolada, em combinações ou em seqüência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução (COLLINS, 1999).

Os mediadores inflamatórios originam-se do plasma ou das células. Os mediadores oriundos do plasma geralmente são encontrados em formas precursoras que devem ser ativadas por clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas. Os mediadores oriundos das células normalmente estão armazenados em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados, ou são sintetizados em resposta ao estímulo inflamatório (COLLINS, 1999; RYAN & MAJNO, 1977).

No plasma, existem três sistemas principais que produzem mediadores que contribuem para as manifestações da resposta inflamatória. O sistema do complemento compreende várias proteínas que são encontradas em maior concentração no plasma. Esse sistema pode ser ativado pelo complexo antígeno-anticorpo, bem como por produtos bacterianos e componentes de outros sistemas de proteínas do plasma. Os componentes desse sistema induzem aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e opsonização e têm papel importante na imunidade inata e adaptativa para defesa contra microorganismos (BARRINGTON *et al.*, 2001; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

O sistema da coagulação também é composto por várias proteínas do plasma. Os fibrinopeptídeos são mediadores inflamatórios potentes e estão relacionados ao aumento dos efeitos das cininas em músculos lisos, à indução do extravasamento de plasma e à quimiotaxia dos neutrófilos. Os fragmentos biologicamente ativos liberados durante a proteólise da fibrina aumentam a permeabilidade vascular na

pele e também induzem a migração dos neutrófilos (RYAN & MAJNO, 1977; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

O terceiro conjunto de mediadores de origem plasmática é representado pelas cininas, que são peptídeos que induzem vários efeitos vasculares e ativam ou sensibilizam nociceptores. A formação desses peptídeos depende da interação de proteínas do plasma (fator XII, pré-caliceína e cininogênio de alto ou de baixo peso molecular) com superfícies carregadas negativamente, como o colágeno e as membranas basais. O principal agente efetor do sistema das cininas é a bradicinina, um peptídeo com nove resíduos de aminoácidos que foi descoberto em 1949 por Rocha e Silva *et al.*

Dos mediadores inflamatórios oriundos do plasma, a bradicinina é o mais estudado. Esse peptídeo induz comportamento nociceptivo espontâneo e alodínia (CAMPOS *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2002), aumenta a permeabilidade vascular (PROUD & KAPLAN, 1988) e induz a migração celular (PASQUALE *et al.*, 1991; SHIGEMATSU *et al.*, 1999), entre outras alterações. Os antagonistas dos receptores B<sub>2</sub> inibem os efeitos agudos da bradicinina (FERREIRA *et al.*, 1993), a hiperalgesia induzida pela carragenina (CAMPOS *et al.*, 1999), as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e caolin, a primeira e a segunda fases da resposta nociceptiva e o edema induzidos pelo formaldeído (CAMPOS *et al.*, 1999). Alguns estudos demonstraram que o receptor B<sub>1</sub> também é importante para a resposta nociceptiva induzida pela bradicinina e por outros estímulos inflamatórios. Os camundongos deficientes dos receptores B<sub>1</sub> apresentam hipoalgesia no teste da placa quente (52 e 55 °C), inibição do comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina e também da primeira e da segunda fases da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (PESQUERO *et al.*, 2000).

Os mediadores de origem celular também contribuem de forma marcante para a indução de vários sinais e sintomas associados à inflamação. Esses mediadores pertencem a diferentes grupos químicos (aminas, lípidos, aminoácidos, proteínas), podendo ser encontrados pré-formados e armazenados em grânulos intracelulares ou serem produzidos sob demanda. Os seus efeitos resultam da interação com enzimas ou receptores específicos.

Entre os mediadores de origem celular, a histamina, uma amina formada a partir da histidina, tem importante papel na indução de alterações que se estabelecem de forma rápida, uma vez que está presente em grânulos e é rapidamente liberada por exocitose durante o processo inflamatório. Quase todos os tecidos contêm histamina, sendo os mastócitos o local predominante de armazenamento (BROWN & ROBERTS II, 2003). A histamina interage com receptores específicos (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>) encontrados em diferentes tecidos. A liberação imediata da histamina faz com que essa amina seja considerada o principal mediador responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial do processo inflamatório (COLLINS, 1999). A injeção intraplantar (i.pl.) da histamina induz edema de pata em animais experimentais (AMANN *et al.*, 1995; ARVIER *et al.*, 1977), uma resposta que depende da interação dessa amina tanto com receptores H<sub>1</sub> (BARNETT *et al.*, 1984; FLYNN & OWEN, 1979) quanto com receptores H<sub>2</sub> (AL-HABOUBI & ZEITLIN, 1982; EZEAMUZIE & UMEZURIKE, 1989). A injeção i.pl. da histamina também induz resposta nociceptiva (HONG & ABBOTT, 1994), que é inibida por antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> (JUAN, 1981). Recentemente, Mobarakeh *et al.* (2000), usando camundongos deficientes para o receptor H<sub>1</sub>, demonstraram que a ausência desse receptor aumenta a latência para os estímulos térmicos e mecânicos e diminui a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído, pela capsaicina e pelo ácido acético.

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina também é uma amina vasoativa de origem celular, formada a partir do triptofano, e está associada a várias condições patológicas, incluindo aquelas associadas à inflamação (HOYER *et al.*, 2002). A 5-HT é um importante mediador inflamatório, sendo liberada principalmente pelas plaquetas em humanos e pelos mastócitos em roedores. Os efeitos da 5-HT resultam da interação com receptores pertencentes a sete famílias, que apresentam ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico, bem como em vários outros tecidos (HOYER *et al.*, 1994 e 2002). A injeção i.pl. da 5-HT induz edema de pata (COLE *et al.*, 1995) e resposta nociceptiva (SUFKA *et al.*, 1992; TAIWO & LEVINE, 1992) em ratos. Vários subtipos de receptores serotoninérgicos, incluindo 5-HT<sub>1A</sub> (TAIWO & LEVINE, 1992), 5-HT<sub>2</sub> (TOKUNAGA *et al.*, 1998) e 5-HT<sub>3</sub> (SUFKA *et al.*, 1992) medeiam a resposta nociceptiva induzida pela 5-HT.



Outro importante grupo de mediadores inflamatórios de origem celular, de natureza lipídica, inclui o fator de ativação plaquetária (FAP) e os eicosanóides. Durante a resposta inflamatória, a fosfolipase  $A_2$  catalisa a clivagem dos fosfolípidos de membrana. Como resultado, ocorre a liberação do liso-FAP, o precursor do FAP, e do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico, também chamado de ácido araquidônico (AA), o precursor dos eicosanóides. O AA também pode ser produzido a partir do diacilglicerol (DAG), pela ação da enzima diacilglicerol lipase. Os eicosanóides são mediadores de natureza lipídica e são representados pelas PGs, tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs) (RANG *et al.*, 2001). Uma vez liberado, o AA é convertido em  $PGG_2$  (reação de ciclooxygenação) e, posteriormente, em  $PGH_2$  (reação de peroxidação) pela enzima ciclooxygenase (COX), também conhecida como  $PGH_2$  sintase. A  $PGH_2$  é convertida em eicosanóides diversos ( $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$  etc), por meio de reações que são catalisadas por isomerases específicas encontradas nos diferentes tecidos. O AA também pode ser convertido em outros mediadores, incluindo os LTs, os ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos e seus hidroxíácidos correspondentes, por meio da ação de outras enzimas, como a 5-lipoxigenase, a 12-lipoxigenase e a 15-lipoxigenase (APPLETON *et al.*, 1996).

A existência de uma isoforma da COX modulada de forma positiva por citocinas e outros estímulos inflamatórios e de forma negativa por antiinflamatórios esteróides foi postulada há vários anos. Entretanto, somente em 1991 uma isoforma induzida da COX foi identificada (KUJUBU *et al.*, 1991; XIE *et al.*, 1991). Essa isoforma foi chamada de COX-2 para fazer distinção da isoforma até então conhecida, chamada de COX-1. Durante certo período, postulou-se que a COX-1 e a COX-2 apresentariam funções bem distintas. A COX-1 teria um papel fisiológico, sendo importante para a proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, controle da pressão arterial e excitabilidade neuronal, entre outras funções. Por outro lado, a COX-2 teria um papel relevante durante o processo inflamatório, sendo importante para a produção dos eicosanóides que contribuem para vários sinais e sintomas associados à inflamação (ADELIZZI, 1999; de LEVAL, 2000; KAM & SEE, 2000). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que essa divisão de funções representa uma simplificação excessiva. Os inibidores seletivos de COX-1 inibem a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em camundongos (TEGEDER *et al.*, 2001), enquanto lesões teciduais podem aumentar a expressão do gene para essa

isoforma (SAMAD *et al.*, 2002; ZHU & EISENACH, 2003). Por outro lado, em muitos órgãos e tecidos, incluindo rins, endotélio e cérebro, há a expressão constitutiva do gene da COX-2, o que permite propor funções fisiológicas para essa isoforma (HINZ & BRUNE, 2002; SAMAD *et al.*, 2002).

Diversos eicosanóides contribuem para o desenvolvimento de vários sinais e sintomas da resposta inflamatória. Concentrações elevadas de eicosanóides, principalmente PGs e LTs, têm sido encontradas em diferentes condições inflamatórias: artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, psoríase, artrite gotosa, colite ulcerativa etc (APPLETON *et al.*, 1996). Estudos conduzidos em animais experimentais demonstraram que a injeção da PGE<sub>2</sub> induz vasodilatação local (WILLIAMS, 1979), o que aumenta o edema induzido por outros mediadores inflamatórios (WILLIAMS, 1982). Apesar da injeção i.pl. da PGE<sub>2</sub> geralmente não causar comportamento nociceptivo espontâneo, esse eicosanóide induz alodínia mecânica e térmica (CHEN, *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 1978) e também aumenta a sensibilidade a outros estímulos inflamatórios (WHELAN *et al.*, 1991). As diferenças entre as respostas induzidas pela PGE<sub>2</sub> e pelos outros eicosanóides, bem como o uso dos agonistas e antagonistas seletivos, permitiram identificar vários receptores para PGs: DP, EP, FP, IP e TP (DONG *et al.*, 1986; KEITH & SALAMA, 1987; KENNEDY *et al.*, 1982). Há evidências de que as alterações periféricas (vasodilatação, sensibilização de nociceptores *etc*) e centrais (febre, anorexia *etc*) induzidas pela PGE<sub>2</sub> podem resultar da interação desse eicosanóide com vários subtipos dos receptores EP (ARMSTRONG *et al.*, 1995; KOBAYASHI & NARUMIYA, 2002).

Durante o processo inflamatório, também ocorre a produção do óxido nítrico (NO), um mediador descoberto em um contexto não relacionado com a inflamação. Em 1980, Furchgott & Zawadsky demonstraram que o endotélio é essencial para o relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pela acetilcolina. Posteriormente, o fator produzido pelo endotélio e responsável por esse efeito foi chamado de fator relaxante derivado de endotélio. Em um congresso no ano de 1986, de forma independente, os grupos liderados por Furchgott e por Ignarro apresentaram resultados que foram publicados em 1988, indicando que o EDRF era o NO (FURCHGOTT, 1988; IGNARRO *et al.*, 1988). Atualmente, sabe-se que o gás NO é

produzido pela desaminação da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase (NOS). Existem três isoformas de NOS, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS). Os genes para as isoformas eNOS e nNOS são expressos continuamente, em baixos níveis, e essas enzimas podem ser ativadas rapidamente pelo aumento da concentração de cálcio no citoplasma. A iNOS, em contraste, é induzida por vários mediadores inflamatórios e produtos bacterianos. Uma vez produzido, o NO se difunde e pode induzir vários efeitos, tanto na célula que o produziu como em células próximas. Um dos alvos moleculares mais conhecidos do NO é a guanilil ciclase, que catalisa a conversão de GTP em GMPc (APPLETON *et al.*, 1996; COLLINS, 1999; MONCADA *et al.*, 1991)

A síntese do NO pode ser inibida *in vivo* e *in vitro* por várias drogas, entre as quais podem ser mencionados vários análogos da L-arginina como o N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) e N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Assim, o uso dessas drogas como ferramentas farmacológicas permite avaliar o papel do NO em diferentes fenômenos biológicos, incluindo a resposta inflamatória. Os inibidores da NOS reduzem o extravasamento de plasma induzido pela carragenina e o edema de pata induzido pela carragenina e dextrana, sugerindo que o NO contribui para o desenvolvimento do processo inflamatório nesses modelos experimentais (IALENTI *et al.*, 1992; MEDEIROS *et al.*, 1995). Além de induzir alterações vasculares durante o processo inflamatório, vários estudos demonstraram que os inibidores da NOS também inibem a resposta nociceptiva induzida pelos diferentes estímulos inflamatórios (DOURSOUT *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2002; TEDESCO *et al.*, 2002). Entretanto, o papel específico do NO no processamento periférico da resposta nociceptiva não é completamente claro, uma vez que há estudos indicando que esse mediador, dependendo da sua concentração local (PRADO *et al.*, 2002) ou do seu local de ação (VIVANCOS *et al.*, 2003), pode induzir efeito antinociceptivo.

Outros mediadores inflamatórios também contribuem para a indução dos sinais e sintomas da inflamação. Vários estudos demonstraram que as citocinas interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzem sensibilização dos nociceptores e edema de pata em vários modelos experimentais (BUCKLEY *et al.*, 1991; DAVIS & PERKINS, 1994; DOUGLASS *et al.*, 1996; FUKUOKA *et al.*, 1994;

HRUBEY *et al.*, 1991; PERKINS *et al.*, 1995). Da mesma forma, essas respostas podem ser induzidas por outros mediadores inflamatórios de natureza protéica como a SP, as neurocininas A e B, o NGF e o CGRP (ALVES *et al.*, 1999; AMANN *et al.*, 1996; BILEVICIUTE *et al.*, 1998; CHU *et al.*, 2000; INOUE *et al.*, 1996; LAM & YIP, 2000; WAJIMA *et al.*, 2000). Entre os mediadores de natureza não protéica, o ATP (HAMILTON *et al.*, 1999; ZIGANSHINA *et al.*, 1996) e os aminoácidos excitatórios como o glutamato (BEIRITH *et al.*, 2002; CAIRNS *et al.*, 2002) também contribuem para a indução dos sinais e sintomas da inflamação.

Conforme mencionado, durante a inflamação aguda há liberação de vários mediadores. Esses mediadores químicos e seus alvos moleculares representam motivo de grande interesse, uma vez que constituem alvos farmacológicos importantes para drogas potencialmente antiinflamatórias. Ao contrário da transdução dos estímulos térmicos e mecânicos, a transdução dos estímulos químicos pelos neurônios é bem conhecida e resulta da interação dos mediadores inflamatórios com receptores específicos na membrana celular. Esses receptores pertencem a três grandes classes: os receptores acoplados aos canais iônicos, receptores com atividade enzimática intrínseca e receptores acoplados à proteína G (WOOD & DOCHERTY, 1997).

Entre os receptores acoplados aos canais iônicos, podem ser mencionados o receptor NMDA (ácido-N-metil-D-aspartico) para o glutamato e o aspartato, o receptor  $P_2X_3$  para o ATP e o receptor 5-HT<sub>3</sub> para a 5-HT. O principal exemplo de receptor com atividade enzimática intrínseca é o receptor para o NGF. Entretanto, a classe mais numerosa é aquela dos receptores acoplados à proteína G. Entre esses, podem ser mencionados os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para a bradicinina, os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> para a 5-HT, os receptores FP, TP e EP para os eicosanóides, os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> para as taquicininas (SP, neurocinina A e neurocinina B), os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> para a histamina e os receptores metabotrópicos mgluR<sub>1</sub> e mgluR<sub>5</sub> para o glutamato e o aspartato (WOOD & DOCHERTY, 1997). A interação dos agonistas com esses receptores pode resultar em ativação ou inibição da adenilato ciclase, ativação da fosfolipase C ou ativação dos canais de potássio, entre outras alterações biológicas.

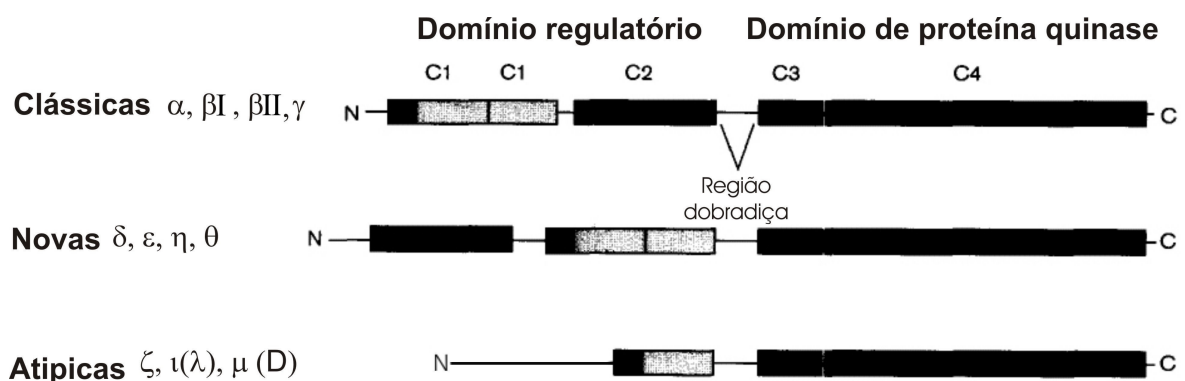
Quanto aos receptores acoplados à proteína G, o grupo de receptores acoplados à proteína  $G_q$  tem sido amplamente estudado. Quando um agonista interage com esses receptores, há dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  da proteína G. A subunidade  $\alpha$  ativa a fosfolipase C, que cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em dois segundos mensageiros: o inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e o DAG. O  $IP_3$  é o produto solúvel em água que se difunde pelo citoplasma, onde estimula a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir dos depósitos intracelulares. Enquanto o  $IP_3$  aumenta a concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$ , o outro produto da clivagem do  $PIP_2$ , o DAG, exerce outros efeitos. O DAG permanece na membrana, onde apresenta dois papéis sinalizadores potenciais: pode ser clivado e liberar AA ou ativar uma enzima chamada proteína quinase C (PKC), sendo essa última ação descoberta por Takai *et al.* (1979). Esses sistemas de segundos mensageiros com duas vias ( $IP_3/Ca^{2+}$  e DAG/PKC) podem atuar de forma independente, sinérgica ou podem exercer um controle negativo entre eles (SLADECZEK, 1987).

A PKC foi originalmente descrita como uma enzima dependente de fosfolípidos e ativada pelo  $Ca^{2+}$ . Recentemente, análises bioquímicas e clonagem molecular revelaram que essa enzima pertence a uma família de 12 serina/treonina quinases (KANASHIRO & KHALIL, 1998). As isoformas, dependendo das suas estruturas e dos substratos e dos fatores que as ativam, podem ser classificadas em três grupos: as isoformas clássicas ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ), dependentes de  $Ca^{2+}$  e ativadas pela fosfatidilserina (PS) e pelo DAG; as isoformas novas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ), independentes de  $Ca^{2+}$  e reguladas pela PS e pelo DAG; e as isoformas atípicas ( $\xi$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ), ativadas por outros componentes derivados de lípidos (HOFMANN, 1997; MELLOR & PARKER, 1998; MOCHLY-ROSEN & KAUVAR, 1998; WAY *et al.*, 2000).

A clonagem das isoformas clássicas da PKC ( $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$ ) revelou que todas consistem de polipeptídeos simples com quatro regiões conservadas (C1-C4) e cinco regiões variáveis (V1-V5) (FIG. 1). A metade amino-terminal, contendo as regiões C1 e C2, provavelmente representa o domínio regulatório que interage com os fosfolípidos, o DAG ou os ésteres de forbol e o  $Ca^{2+}$ . A metade carboxil-terminal, contendo as regiões C3 e C4, representa o domínio proteína quinase que possui

seqüências de resíduos de aminoácidos que se assemelham àquelas de outras proteínas quinases (KANASHIRO & KHALIL, 1998).

A PKC é amplamente distribuída nos tecidos e, geralmente, é encontrada em uma forma solúvel e inativa. A ativação da PKC está associada a sua translocação para diferentes compartimentos celulares, incluindo a membrana citoplasmática, onde exerce importante papel na regulação de proteínas de membrana como canais iônicos e receptores (KACZMAREK, 1987; NISHIZUKA, 1986; POOLE *et al.*, 2004).

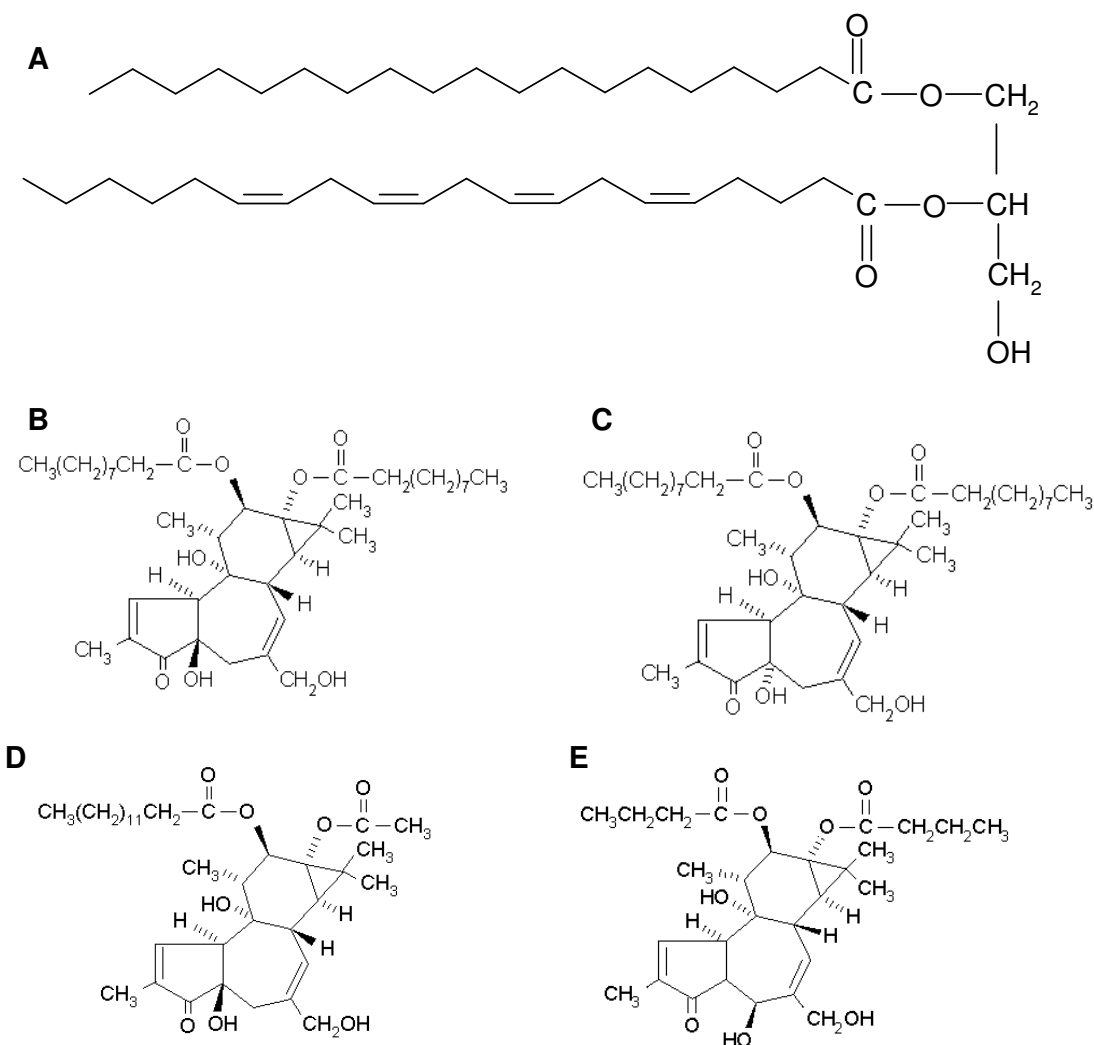


**Figura 1** – Representações esquemáticas das estruturas primárias das isoformas da PKC. Adaptado de Newton (1997).

Alguns produtos são usados para ativar a PKC e, dessa forma, investigar o papel dessa enzima em diferentes processos fisiológicos ou patológicos. Os ésteres de forbol atuam de forma similar ao DAG e ativam a PKC diretamente *in vivo* e *in vitro*. A ativação da PKC pelos ésteres de forbol ou análogos do DAG está associada à translocação da enzima do citoplasma para a membrana plasmática. Além disso, esses compostos aumentam a afinidade da PKC pelo  $Ca^{2+}$ , o que pode permitir a ativação da PKC em concentrações fisiológicas desse cátion (NISHIZUKA, 1986). A Figura 2 representa as estruturas do DAG e de alguns ésteres de forbol, bem como de um análogo inativo.

Embora sejam usados freqüentemente para o estudo das funções da PKC, os ésteres de forbol apresentam alguns inconvenientes. Estudos recentes demonstraram que a PKC não é o único receptor para o DAG ou para os ésteres de forbol. Pelo menos cinco famílias de moléculas apresentam o domínio C1 e podem

servir como receptores para essas duas moléculas (CALOCA *et al.*, 2003; GEIGER *et al.*, 2003; KAZANIETZ, 2002; YANG & KAZANIETZ, 2003). Além disso, ao contrário do DAG que está presente de forma transitória na membrana, os ésteres de forbol são lentamente biotransformados. Dessa forma, a resposta induzida por esses compostos pode representar uma distorção do processo natural (MILLER, 1986; NISHIZUKA, 1986). Apesar de não representarem ferramentas farmacológicas perfeitas, os ésteres de forbol são amplamente usados em estudos nos quais se investiga o papel da PKC em diferentes fenômenos biológicos.



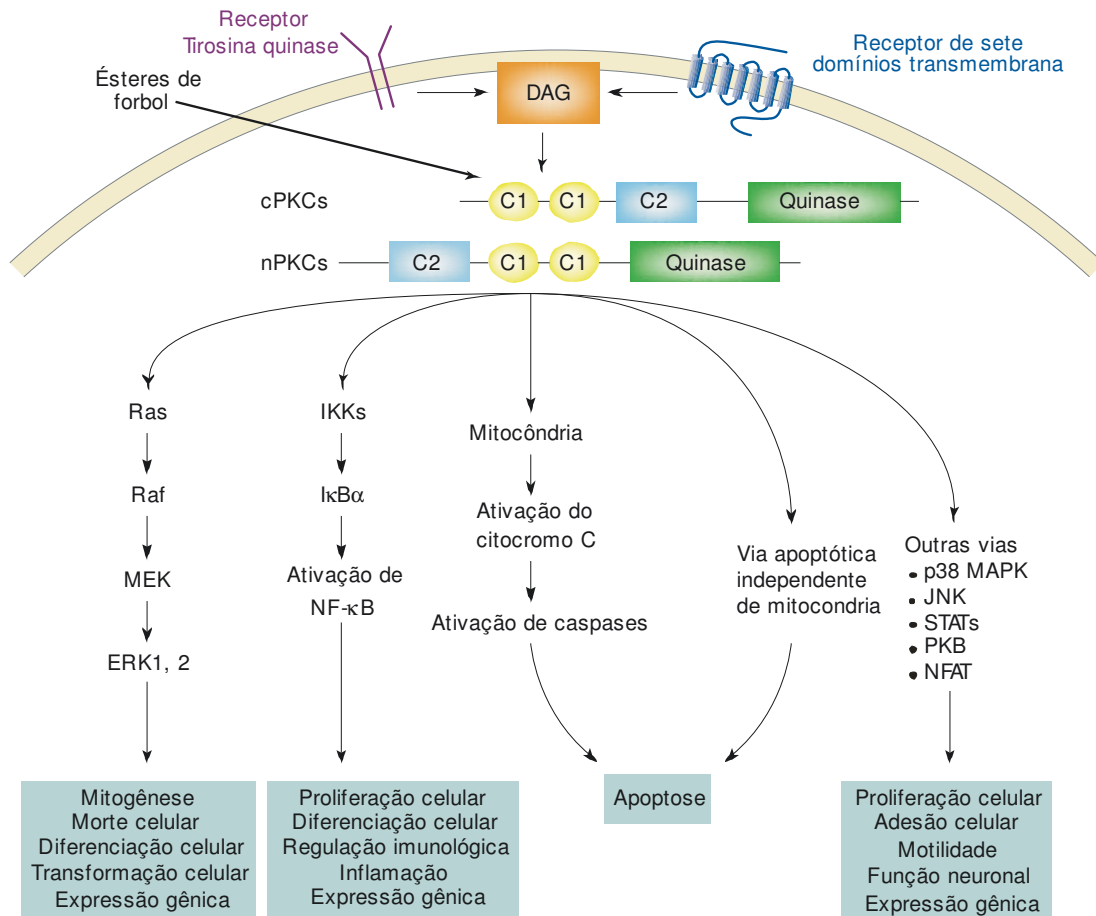
**Figura 2** – Estruturas do DAG e de alguns ésteres de forbol. **A.** DAG. **B.** Forbol-12,13-didecanoato (PDD). **C.** Análogo inativo do PDD, 4 $\alpha$ -PDD. **D.** Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA ou TPA). **E.** Forbol 12,13-dibutirato (PDBu).

O uso dos ésteres de forbol e de outras ferramentas farmacológicas permitiu a identificação de várias funções da PKC, representadas na Figura 3, incluindo o envolvimento na exocitose, modulação da condutância iônica, contração de músculo liso, expressão gênica, proliferação e diferenciação celular e apoptose (KANASHIRO & KHALIL, 1998; YANG & KAZANIETZ, 2003).

Além da participação nos eventos mencionados, a PKC exerce importante papel durante o processo inflamatório. Estudos demonstraram que, durante a inflamação, há um aumento da atividade da PKC, resultante da translocação da enzima do citoplasma para a membrana plasmática. Shapira *et al.* (1997) demonstraram que em macrófagos estimulados pelo LPS há um aumento da atividade da PKC. De forma semelhante, Chang *et al.* (2000) observaram que algumas isoformas da PKC são ativadas durante a colite induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos. Outros estudos também demonstraram a ativação de algumas isoformas da PKC durante o processo inflamatório induzido por diferentes estímulos (CORSINI *et al.*, 1999; HUDA *et al.*, 2004; SAVKOVIC *et al.*, 2003).

Em suporte a um importante papel da PKC durante o processo inflamatório, tem sido demonstrado que a ativação dessa enzima induz a liberação de mediadores inflamatórios *in vitro*. Os ésteres de forbol induzem a liberação da histamina pelos mastócitos de ratos, uma resposta que é exacerbada na presença de um ionóforo de cálcio (CHAKRAVARTY, 1990; GROSMAN & NIELSEN, 1988; HEIMAN & CREWS, 1985; SAGI-EISENBERG *et al.*, 1985). Por outro lado, o inibidor da PKC, UCN-01, reduz a liberação da histamina induzida pela anti-imunoglobulina E, pelo ionóforo de cálcio e pelos ésteres de forbol (TAKEI & ENDO, 1993). Outros estudos também demonstraram que a ativação da PKC estimula a produção de algumas citocinas inflamatórias pelos monócitos humanos, incluindo o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6 (KONTNY *et al.*, 1999), e aumenta a expressão do gene da COX-2 (MILLER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2001).





**Figura 3** – Regulação das vias de sinalização pelas isoformas da PKC sensíveis ao DAG e aos ésteres de forbol. Adaptado de Yang & Kazanietz (2003).

Experimentos *in vivo* também confirmaram o importante papel da PKC na resposta inflamatória. A aplicação tópica dos ativadores da PKC induz edema na orelha de cobaias (DELESCLUSE *et al.*, 1987) e de camundongos (HUGUET *et al.*, 2000; PUIGNERÓ & QUERALT, 1997; RICKINGER *et al.*, 1994; Lo VERME *et al.*, 2004). A injeção do PMA na pata de camundongos também induz aumento da permeabilidade vascular, avaliado por meio do extravasamento de corante (QU *et al.*, 1990). Ohuchi *et al.* (1987) demonstraram que a injeção do TPA no dorso de ratos aumenta a permeabilidade vascular, uma resposta que é inibida pelo tratamento com os antagonistas dos receptores para a histamina e 5-HT.

Existem vários estudos que também investigaram o papel da PKC na excitabilidade neuronal, bem como no processamento nociceptivo espinhal e periférico. O PDBu aumenta a atividade basal dos nociceptores polimodais do testículos de cães e a

sua resposta ao calor, sendo ambos os efeitos inibidos pela estaurosporina, um inibidor da PKC (LENG *et al.*, 1996). Em outro estudo, Mizumura *et al.* (1997) demonstraram que a ativação da PKC exerce um importante papel nos efeitos excitatórios da bradicinina nos nociceptores *in vitro*.

Alguns estudos recentes demonstraram aspectos mais detalhados dos mecanismos pelos quais a PKC modula a atividade de receptores relacionados com a transdução dos estímulos nocivos. Os ativadores da PKC induzem correntes através dos receptores TRPV1 em temperatura ambiente, na ausência de qualquer agonista. Por outro lado, a corrente induzida por um agonista de receptores TRPV1, a anandamida, foi atenuada pelos inibidores da PKC (PREMKUMAR & AHERN, 2000). Crandall *et al.* (2002), usando oócitos de *Xenopus laevis* transfectados com os receptores TRPV1, também demonstraram que os ativadores da PKC induzem corrente através desse canal e o sensibilizam ao calor e à redução do pH. Recentemente, outro estudo demonstrou que a ativação da PKC sensibiliza os receptores TRPV1, porém não os ativa (BHAVE *et al.*, 2003).

Além dos estudos *in vitro*, alguns estudos *in vivo* demonstraram o papel da PKC no processamento central e periférico da resposta nociceptiva. Coderre (1992) demonstrou que a PKC na medula espinhal é importante para resposta nociceptiva induzida pela injeção de formaldeído na pata posterior de ratos. Nesse estudo, foi observado que a injeção intratecal (i.t.) de um ativador (PMA) e de um inibidor (H-7) da PKC aumentou e reduziu, respectivamente, a resposta induzida pelo formaldeído. Em outro estudo, Hua *et al.* (1999) investigaram os efeitos da inibição da PKC espinhal em um modelo de alodínia mecânica induzida pela ligadura de nervo em ratos. Nesse estudo, foi observado que a injeção i.t. de GF109203X, PKC 19-31 ou queleritrina, inibidores da PKC, reduz a alodínia de forma dose-dependente. Palecek *et al.* (1999) também demonstraram que a injeção de um ativador da PKC na medula espinhal induz sensibilização a estímulos térmicos e mecânicos aplicados na pata de ratos.

Estudos imunohistoquímicos fornecem sustentação a muitos dos resultados mencionados. Frayer *et al.* (1999) demonstraram que a infusão de PDBu na medula espinhal aumenta a imunorreatividade local para a SP e o CGRP. Esse aumento não

é observado após a administração do análogo inativo do PDBu e é inibido pelo tratamento com a bisindolilmaleimida I, um inibidor da PKC. Nesse estudo, foi verificado um aumento do conteúdo extracelular do aspartato e glutamato após a infusão do PDBu. Além das alterações medulares, a administração i.t. do PDBu induz comportamento nociceptivo espontâneo em camundongos, acompanhado de um aumento da imunorreatividade de Fos no núcleo parafascicular, na amígdala e no córtex cingulato, sugerindo que a ativação espinal da PKC resulta em aumento da atividade neuronal nessas regiões supraespinhais (NARITA *et al.*, 2004).

Apesar do crescente conhecimento do papel funcional das diferentes isoformas da PKC, até recentemente não havia qualquer estudo *in vivo* que demonstrasse o papel da PKC no processamento periférico da resposta nociceptiva. Porém, Khasar *et al.* (1999) demonstraram que a alodínia térmica e mecânica induzida pela injeção i.pl. da epinefrina e a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético são atenuadas de forma marcante em animais deficientes da PKC $\epsilon$ . Nesse estudo, também foi observado que a injeção intradérmica de um peptídeo que inibe seletivamente essa enzima atenua a alodínia induzida pela epinefrina, pela carragenina e pelo NGF em camundongos normais e, também, o aumento da corrente em canais de Na<sup>+</sup> resistentes à tetrodotoxina induzido pela epinefrina em neurônios do GRD. Em suporte ao envolvimento da PKC $\epsilon$  nos mecanismos periféricos de nocicepção, Cesare *et al.* (1999) demonstraram que, entre as cinco isoformas da PKC presentes em neurônios do GRD, somente a isoforma  $\epsilon$  é translocada e, conseqüentemente, ativada após o tratamento com a bradicinina. Além disso, o efeito facilitatório da bradicinina sobre as correntes iônicas induzidas pelo calor é atenuado pelo mesmo peptídeo inibidor da PKC $\epsilon$  usado no estudo de Khasar *et al.* (1999).

Recentemente, Souza *et al.* (2002) também apresentaram evidências de que a PKC é importante para o processamento nociceptivo periférico *in vivo*. Nesse estudo, a injeção i.pl. do PDD, um ativador da PKC, induziu alodínia térmica ipsilateral em ratos que foi inibida pela co-injeção de queleritrina, um inibidor da PKC. Da mesma maneira, o éster de forbol induziu a alodínia mecânica em ratos e o comportamento nociceptivo espontâneo em camundongos. Nesse estudo, também foi demonstrado o envolvimento periférico da PKC na resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído

em camundongos. Esses resultados confirmam o papel periférico da PKC nesses modelos experimentais.

Apesar da existência de vários estudos demonstrando o envolvimento da PKC no processamento periférico e central da resposta nociceptiva, não há estudos que tenham caracterizado de forma ampla a resposta nociceptiva e o edema de pata induzidos pela ativação periférica da PKC, bem como investigado os mecanismos envolvidos nessas respostas. Essas investigações são importantes para ampliar o conhecimento do papel da PKC no processamento nociceptivo periférico e no edema associados ao processo inflamatório.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 *Objetivo geral*

Uma vez que muitos estudos indicam que diferentes isoformas da PKC são importantes para o processamento espinhal e periférico da resposta nociceptiva e também para a produção de mediadores que contribuem para o desenvolvimento de outras manifestações da resposta inflamatória, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de um ativador dessa enzima e comparar os resultados obtidos com aqueles induzidos pela carragenina.

### 2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 Caracterizar a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de um ativador da PKC, PDD.

2.2.2 Avaliar o papel de eicosanóides, 5-HT, histamina e NO no desenvolvimento da alodínia mecânica e do edema induzidos pela injeção i.pl. do PDD ou da carragenina.

### 2.3 *Justificativa*

Existem várias abordagens, adaptadas dos postulados de Koch, para determinar o papel de uma substância em uma resposta biológica. Dessa forma, a investigação de diferentes aspectos é necessária para que seja definido o papel periférico da PKC durante processo inflamatório.

Uma dessas abordagens é verificar se ocorre ativação da PKC durante o processo inflamatório induzido por diversos estímulos. Alguns estudos demonstraram que há um aumento da atividade da PKC em células expostas a estímulos inflamatórios *in vitro* e também em fragmentos de tecidos obtidos de sítios inflamatórios (CHANG *et*

*al.*, 2000; CORSINI *et al.*, 1999; HUDA *et al.*, 2004; SAVKOVIC *et al.*, 2003; SHAPIRA *et al.*, 1997).

Outra abordagem envolve a avaliação da resposta inflamatória após inibição da atividade de uma ou mais isoformas da PKC por meio do uso de inibidores enzimáticos, RNA antisense ou animais deficientes para uma isoforma da enzima. Estudos que usaram essas técnicas também proporcionaram resultados que dão suporte ao papel da PKC na resposta inflamatória (HUA *et al.*; 1999; MIZUMURA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2002).

Por fim, espera-se que um ativador da PKC, de forma semelhante a vários estímulos inflamatórios, induza sinais e sintomas característicos da inflamação, como edema e alodínia. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que ésteres de forbol induzem correntes iônicas em neurônios sensoriais, bem como a liberação de mediadores inflamatórios por diferentes células (CHAKRAVARTY, 1990; GROSMAN & NIELSEN, 1988; HEIMAN & CREWS, 1985; LENG *et al.*, 1996; MIZUMURA *et al.*, 1997; SAGI-EISENBERG *et al.*, 1985). A avaliação do papel periférico da PKC por meio da última abordagem mencionada, especificamente quanto à resposta nociceptiva, só foi feita recentemente por Souza *et al.* (2002).

Dessa forma, no presente estudo foram caracterizadas, de forma ampla, a resposta nociceptiva e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de um ativador da PKC, uma investigação que ainda não foi conduzida e que pode contribuir para a melhor compreensão do papel da PKC nesses fenômenos. A comparação das respostas induzidas por um ativador da PKC e pela carragenina pode proporcionar informações sobre as vias bioquímicas ativadas por esses dois estímulos inflamatórios e determinar se a resposta induzida por um ativador da PKC é tão inespecífica quanto àquela induzida pela carragenina.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram usados ratos Wistar machos (200 - 300 g) e camundongos Swiss machos (30 - 35 g). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em uma sala com temperatura controlada ( $27 \pm 1$  °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 100/2004).

### 3.2 Drogas

- Carragenina  $\lambda$  (Sigma, USA) – Estímulo inflamatório. Suspensão preparada em salina nas concentrações de 0,1% (50  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ) ou 1% (500  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ).
- Cetotifeno (Fumarato ácido, Novartis, Brasil) – Inibidor da desgranulação dos mastócitos e antagonista dos receptores  $H_1$  para a histamina. Solução contendo 1 mg/mL.
- Dexametasona (Fosfato, Sigma, USA) – Antiinflamatório esteróide. Solução preparada em salina.
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Brasil) – Veículo.
- Forbol-12,13-didecanoato (PDD, Sigma, USA) – Ativador da PKC. Solução estoque preparada em DMSO 100% e mantida a  $-70$  °C em tubetes contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .
- 4- $\alpha$ -Forbol-12,13-didecanoato (4- $\alpha$ -PDD, Sigma, USA) – Análogo inativo do PDD. Solução estoque preparada em DMSO 100% e mantida a  $-70$  °C em tubetes contendo 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

- Indometacina (Sigma, USA) – Antiinflamatório não-esteróide. Solução preparada em NaHCO<sub>3</sub> 0,5% diluído em salina.
- Metisergida (Maleato ácido, Novartis, Brasil) – Antagonista não-seletivo dos receptores para a 5-HT. Drágea contendo 1 mg da metisergida foi diluída em salina.
- Morfina (Sulfato pentahidratado, Cristália, Brasil) – Analgésico opióide. Solução preparada em salina.
- N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (Cloridrato, L-NAME, Sigma, USA) – Inibidor da síntese do NO. Solução preparada em salina.
- Prometazina (Cloridrato, Rhodia, Brasil) – Antagonista dos receptores H<sub>1</sub> para a histamina. Ampola contendo solução injetável (50 mg/2 mL) foi diluída em salina.
- Rofecoxib (MSD, Brasil) – Antiinflamatório não-esteróide. Comprimido contendo 50 mg do rofecoxib foi diluído em salina.

O PDD e o 4 $\alpha$ -PDD foram mantidos em solução estoque a -70 °C. Imediatamente antes das injeções, essas drogas foram diluídas em salina, de forma a serem obtidas as concentrações adequadas para cada protocolo experimental. Durante o período da injeção, essas drogas foram mantidas em recipiente contendo gelo. A concentração do DMSO no veículo dependeu das concentrações das drogas usadas e correspondeu à concentração do DMSO presente na solução mais concentrada, quando duas ou mais doses foram usadas. A injeção i.pl. foi realizada com o auxílio de outro experimentador, sendo usada uma flanela para contenção do animal. O volume injetado por via i.pl. foi 50  $\mu$ L.

Nos protocolos no quais se avaliou o efeito da injeção i.pl. da indometacina e do L-NAME, os animais receberam duas injeções i.pl. (50  $\mu$ L cada) com um intervalo de 30 min entre cada injeção.

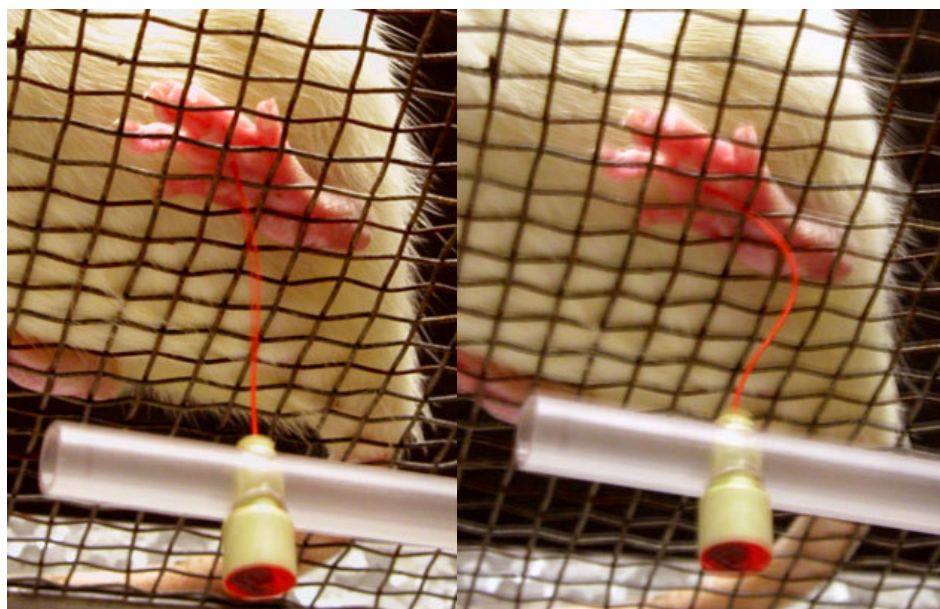
Para os tratamentos sistêmicos, as soluções ou suspensões foram preparadas imediatamente antes da injeção. Durante o período da injeção, L-NAME foi mantido em recipiente contendo gelo e as demais drogas foram mantidas à temperatura ambiente. O volume injetado por via i.p. ou administrado *per os* foi de 1 mL/kg para ratos e de 4 mL/kg para camundongos, exceto no protocolo para avaliar o efeito do



cetotifeno, no qual o volume injetado foi de 4 mL/kg, dividido em duas injeções (2 x 2 mL/kg) com um intervalo de 30 min entre cada injeção.

### 3.3 Avaliação da alodínia mecânica em ratos

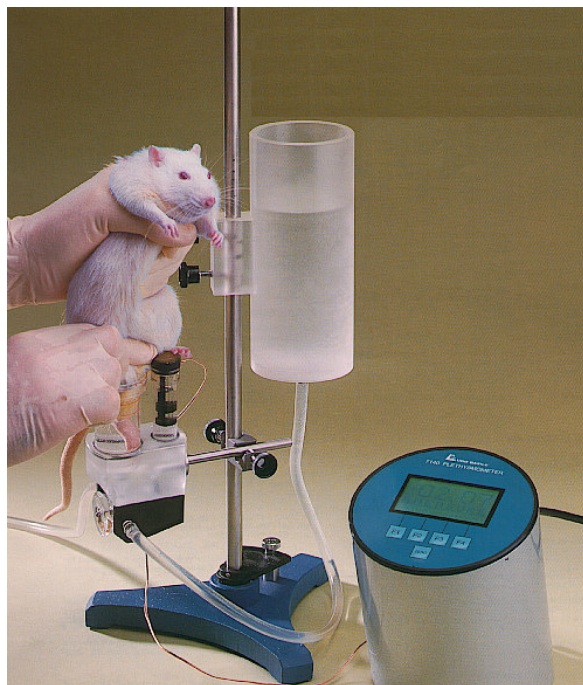
Nos dois dias anteriores ao experimento, os ratos foram colocados em compartimentos de acrílico (22x18x14 cm) dispostos sobre uma tela metálica. No dia do experimento, após nova ambientação, foi realizada a estimulação mecânica da pata posterior com um filamento de nylon (Estesiômetro, Sorri, Brasil), que, ao ser pressionado até que se curve (FIG. 4), exerce uma força de 100 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 fossem similares para os diversos grupos. A frequência para retirada da pata foi novamente determinada em diferentes momentos após a injeção do PDD ou da carragenina. Os resultados foram expressos como frequência de retirada da pata aos dez toques realizados.



**Figura 4** – Avaliação da alodínia mecânica por meio do uso de filamento de nylon.

### 3.4 Avaliação do edema de pata em ratos

Para a avaliação do volume de pata, foi usado um plestismômetro (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. 5). 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 para os diversos grupos fossem similares. O volume de pata foi novamente determinado em diferentes momentos após a injeção do PDD ou da carragenina. Os resultados foram expressos como variação do volume da pata em relação ao volume basal.



**Figura 5** – Avaliação do edema de pata por meio do uso do plestismômetro.

### *3.5 Avaliação da resposta nociceptiva no modelo da placa quente em camundongos*

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 para ambientação. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre uma placa metálica em contato direto com água aquecida a 56 °C, 30 min após a injeção i.p. da morfina ou salina. O tempo para que os animais agitassem ou lambessem as patas ou saltassem foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. O tempo de corte foi de 30 s.

### *3.6 Análise estatística*

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

### 3.7 Protocolos experimentais

<b>Parâmetro avaliado</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Gráfico</b>	<b>Página</b>
Alodínia	Efeito da injeção i.pl. de DMSO 0,2% ou PDD (0,01 ou 0,1 µg) sobre a frequência de retirada da pata.	FIG.6	46
	Efeito da injeção i.pl. de DMSO 0,2%, PDD ou 4α-PDD (0,1 µg) sobre a frequência de retirada da pata.	FIG.7	47
	Efeito da injeção i.pl. de salina ou carragenina (50 ou 500 µg) sobre a frequência de retirada da pata.	FIG.8	48
Edema	Efeito da injeção i.pl. de DMSO 0,2% ou PDD (0,001, 0,01 ou 0,1 µg) sobre o volume de pata.	FIG.9	49
	Efeito da injeção i.pl. de DMSO 0,2%, PDD ou 4α-PDD (0,1 µg) sobre o volume de pata.	FIG.10	50
	Efeito da injeção i.pl. de salina ou carragenina (50 ou 500 µg) sobre o volume de pata.	FIG.11	51
Alodínia	Efeito da dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.12A	53
	Efeito da dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pela carragenina.	FIG.12B	53
Edema	Efeito da dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.13A	54
	Efeito da dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.13B	54
Alodínia	Efeito da indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.14A	56
	Efeito da indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pela carragenina.	FIG.14B	56

Edema	Efeito da indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.15A	57
	Efeito da indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.15B	57
Alodínia	Efeito do rofecoxib (5 ou 10 mg/kg; <i>per os</i> ) sobre sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.16A	58
	Efeito do rofecoxib (5 ou 10 mg/kg; <i>per os</i> ) sobre sobre a alodínia mecânica induzida pela carragenina.	FIG.16B	58
Edema	Efeito do rofecoxib (5 ou 10 mg/kg; <i>per os</i> ) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.17	59
Alodínia	Efeito do L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.18A	61
	Efeito do L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pela carragenina.	FIG.18B	61
Edema	Efeito do L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.19A	62
	Efeito do L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.19B	62
Alodínia	Efeito da indometacina (2 mg/kg; i.p.) e/ou L-NAME (100 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.20	63
Alodínia	Efeito da metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.21A	66
	Efeito da metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pela carragenina.	FIG.21B	66
Edema	Efeito da metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.22A	67
	Efeito da metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.22B	67
Alodínia	Efeito da prometazina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.23	68

Alodínia	Efeito da injeção da prometazina (10 mg/kg, i.p.) sobre a freqüência de retirada da pata.	FIG.24	69
Edema	Efeito da prometazina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.25A	70
	Efeito da prometazina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pela carragenina.	FIG.25B	70
Edema	Efeito do cetotifeno (1 ou 4 mg/kg; i.p.) sobre o edema de pata induzido pelo PDD.	FIG.26	71
Alodínia	Efeito da morfina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.27A	73
	Efeito da morfina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.27B	73
Nocicepção (placa quente)	Efeito da morfina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) sobre a latência para resposta nociceptiva em camundongos.	FIG.28	74
Alodínia	Efeito da indometacina (50 ou 100 µg/50 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.29	76
	Efeito do L-NAME (50 ou 100 µg/50 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD.	FIG.30	77

## 4 RESULTADOS

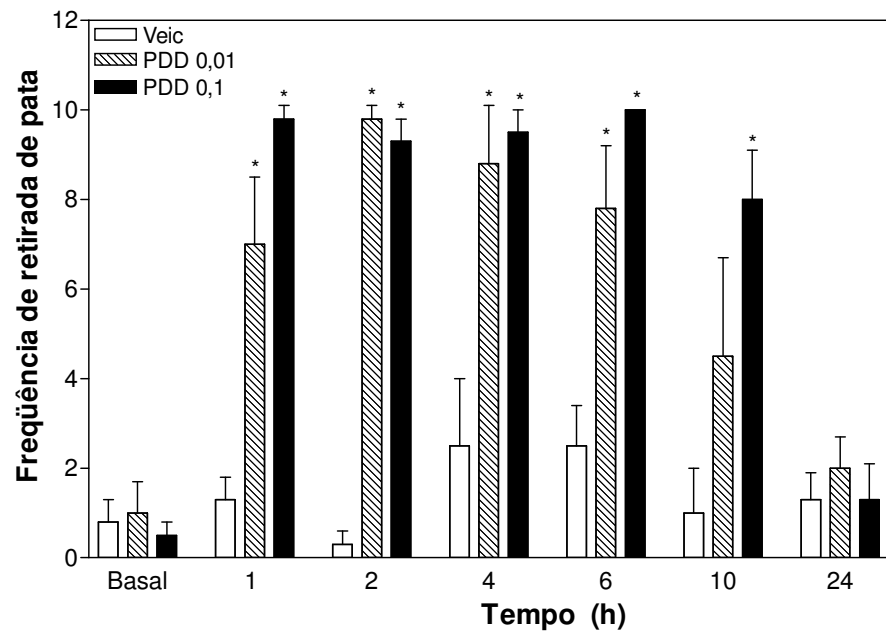
### *4.1 Alodínia mecânica e edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina*

A injeção i.pl. do PDD (0,01 ou 0,1 µg) aumentou a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica (FIG. 6). A alodínia mecânica induzida pela maior dose se estabeleceu 1 h após a injeção e durou pelo menos 10 h. Na 24<sup>a</sup> hora, não se observou alodínia mecânica. A injeção i.pl. do análogo inativo 4α-PDD (0,1 µg) não alterou a frequência de retirada da pata (FIG. 7).

A Figura 8 demonstra a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica após a injeção i.pl. da carragenina (50 ou 500 µg). A maior dose da carragenina induziu alodínia mecânica que se estabeleceu 1 h após a injeção e durou pelo menos 54 h.

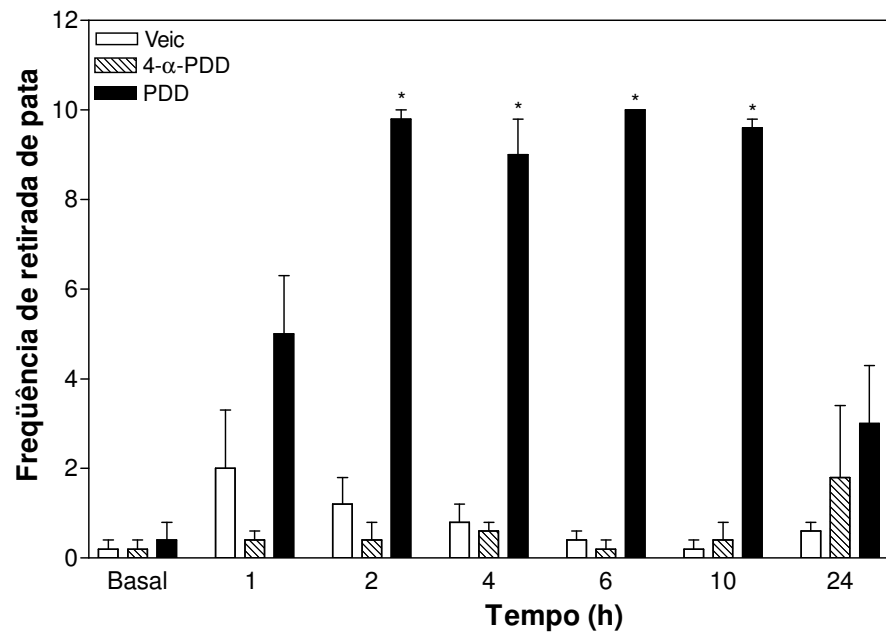
A injeção i.pl. do PDD (0,001, 0,01 ou 0,1 µg) também induziu edema de pata. A maior dose do PDD induziu edema marcante, que se estabeleceu após 1 h e durou até 24 h (FIG. 9). A injeção i.pl. do análogo inativo 4α-PDD (0,1 µg) não alterou o volume de pata (FIG. 10).

O edema também foi observado após a injeção i.pl. da carragenina (50 ou 500 µg). A maior dose da carragenina induziu aumento do volume de pata que foi estatisticamente significativo a partir de 1 h e se manteve por pelo menos 72 h, sendo a resposta máxima observada 3 h após a injeção (FIG. 11).

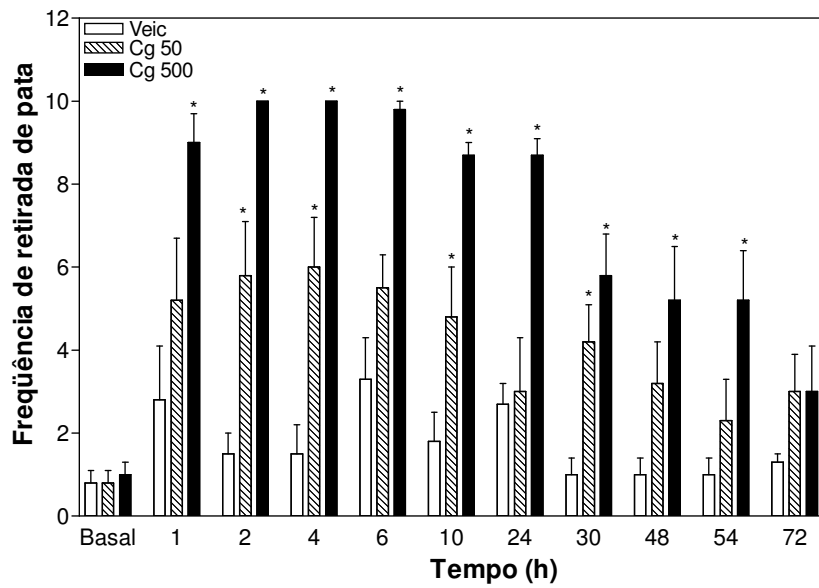


**Figura 6** – Efeito do PDD sobre a freqüência de retirada da pata à estimulação mecânica. Veículo (DMSO 0,2%) ou PDD (0,01 ou 0,1 µg) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=4).

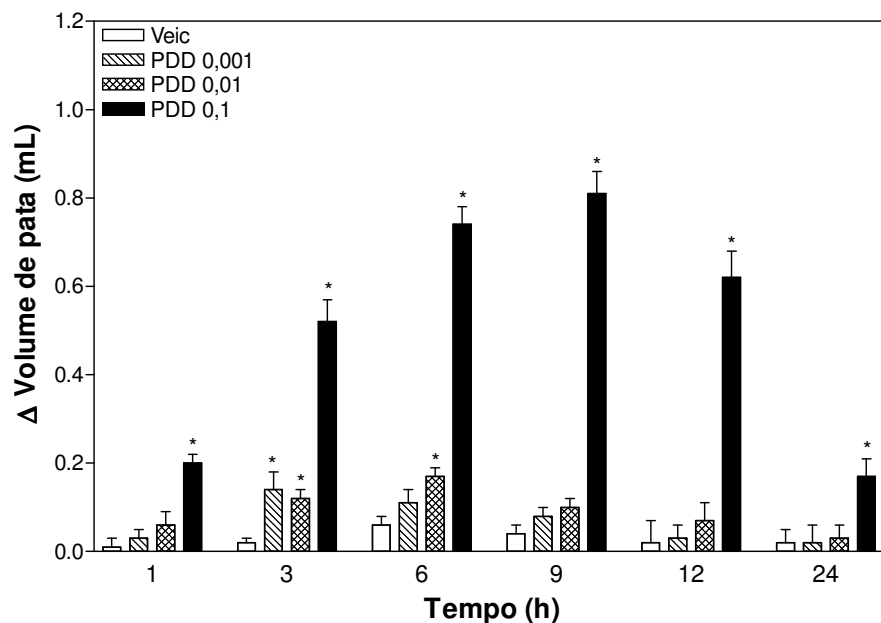




**Figura 7** – Efeito do PDD ou 4 $\alpha$ -PDD sobre a frequência de retirada da pata à estimulação mecânica. Veículo (DMSO 0,2%), PDD ou 4 $\alpha$ -PDD (0,1  $\mu$ g) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5).

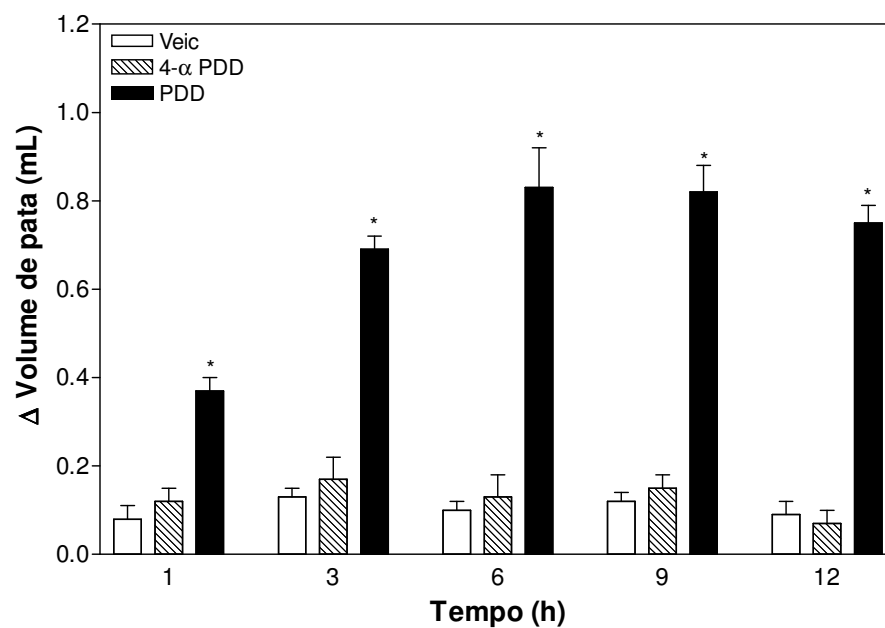


**Figura 8** – Efeito da carragenina sobre a freqüência de retirada da pata à estimulação mecânica. Veículo (salina) ou carragenina (50 ou 500 µg) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=6).



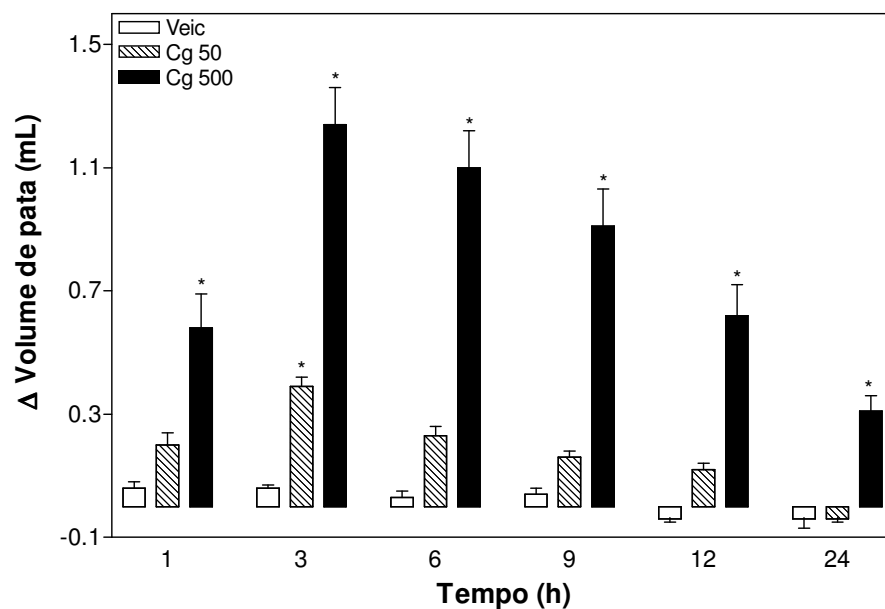
**Figura 9** – Efeito do PDD sobre o volume da pata. Veículo (DMSO 0,2%) ou PDD (0,001; 0,01 ou 0,1  $\mu\text{g}$ ) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).

Grupo	Volume basal de pata (mL)
<b>Veículo</b>	1,20 $\pm$ 0,03
<b>PDD 0,001 <math>\mu\text{g}</math></b>	1,21 $\pm$ 0,02
<b>PDD 0,01 <math>\mu\text{g}</math></b>	1,21 $\pm$ 0,02
<b>PDD 0,1 <math>\mu\text{g}</math></b>	1,21 $\pm$ 0,02



**Figura 10** – Efeito do PDD ou 4 $\alpha$ -PDD sobre o volume da pata. Veículo (DMSO 0,2%), PDD ou 4 $\alpha$ -PDD (0,1  $\mu$ g) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)
Veículo	1,31 $\pm$ 0,03
4 $\alpha$ -PDD 0,1 $\mu$ g	1,30 $\pm$ 0,02
PDD 0,1 $\mu$ g	1,31 $\pm$ 0,03

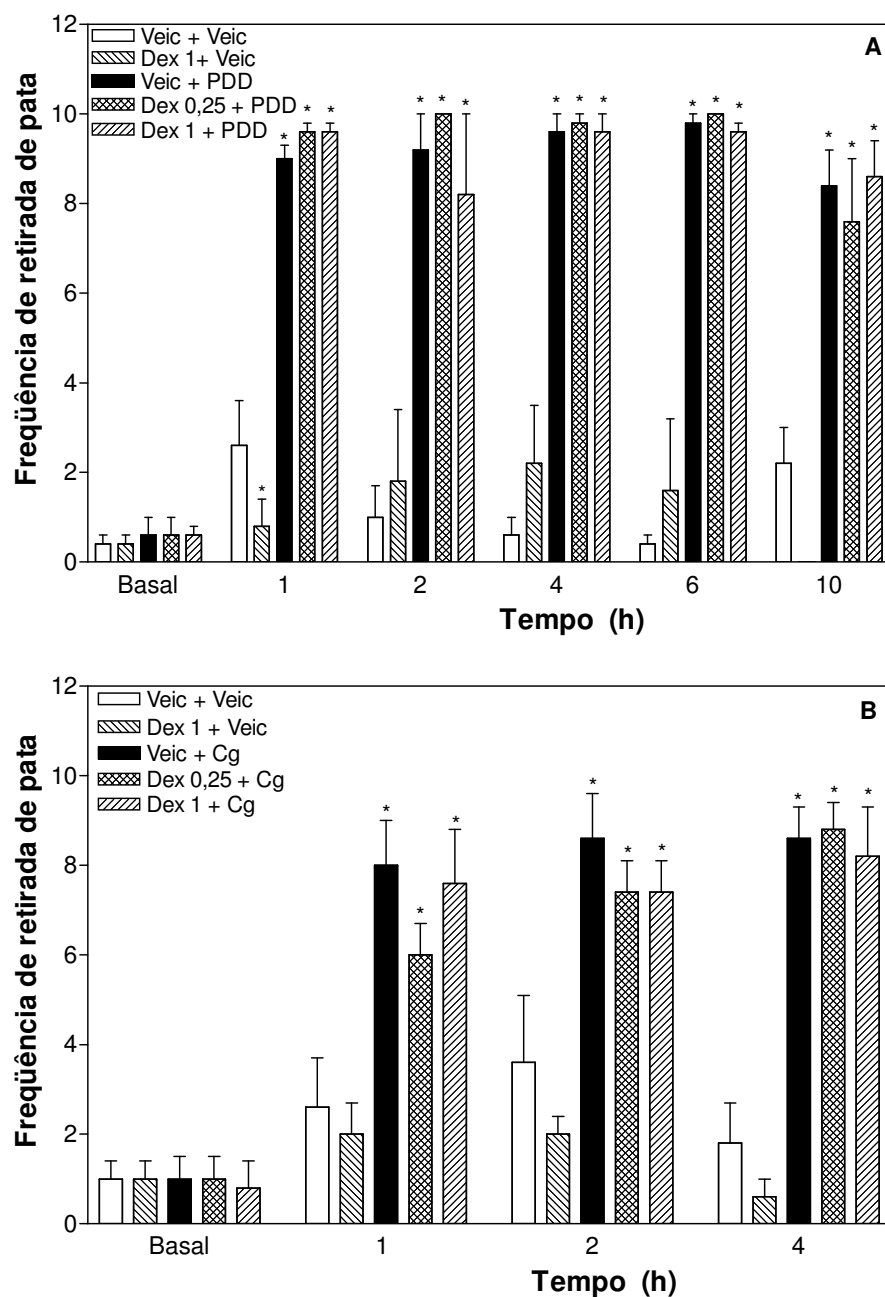


**Figura 11** – Efeito da carragenina sobre o volume da pata. Veículo (salina) ou carragenina (50 ou 500  $\mu\text{g}$ ) foram injetados por via i.pl. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  ( $n=6$ ).

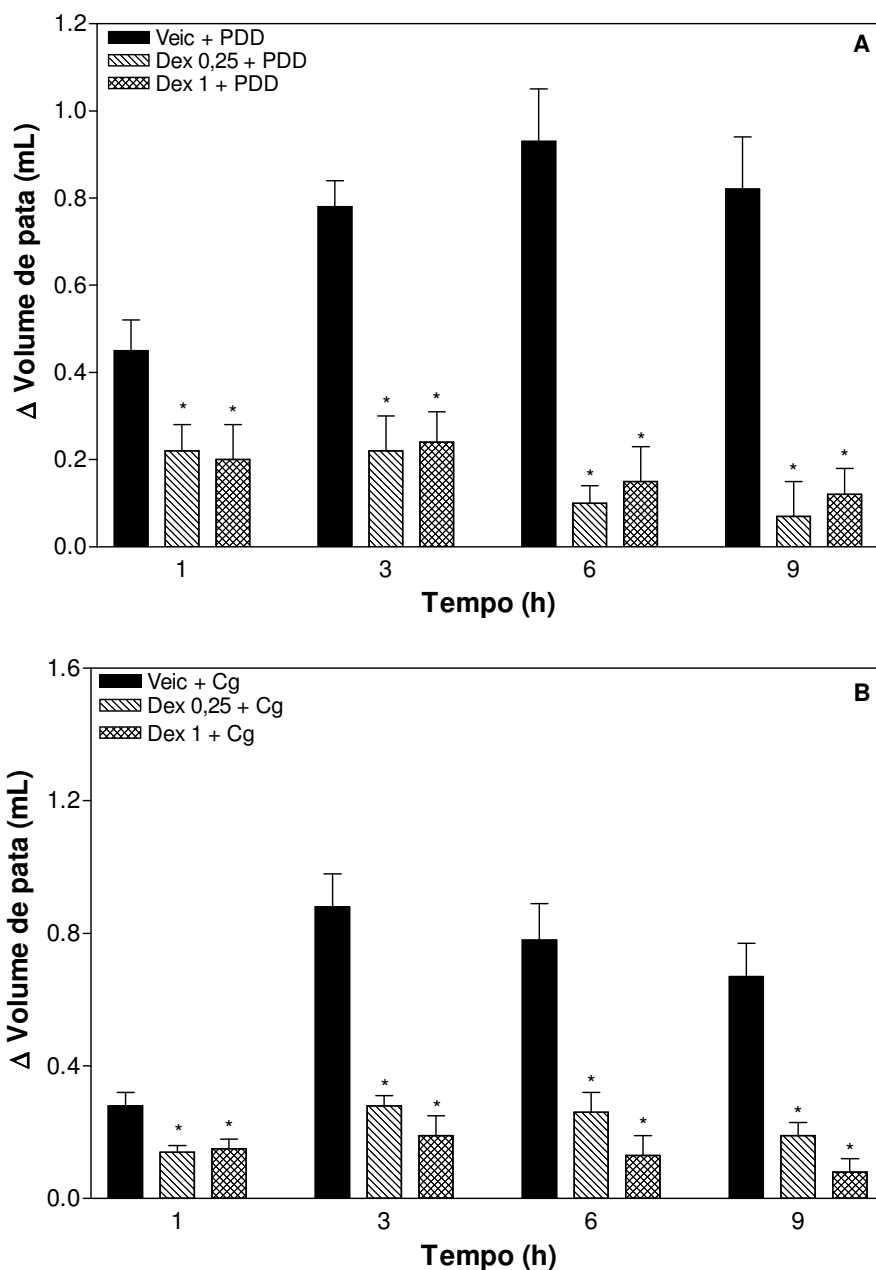
Grupo	Volume basal de pata (mL)
<b>Veículo</b>	$1,37 \pm 0,02$
<b>Carragenina 50 <math>\mu\text{g}</math></b>	$1,38 \pm 0,02$
<b>Carragenina 500 <math>\mu\text{g}</math></b>	$1,38 \pm 0,02$

#### *4.2 Efeito da dexametasona sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina*

A administração i.p. da dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg), um antiinflamatório esteróide, 1 h antes, não alterou a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 12A) ou pela carragenina (FIG. 12B). Por outro lado, o pré-tratamento com a dexametasona aboliu o edema de pata induzido pelo PDD (FIG. 13A) ou pela carragenina (FIG. 13B) durante todo o curso temporal.



**Figura 12** – Efeito da dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5).



**Figura 13** – Efeito da dexametasona sobre o edema de pata induzido pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Dexametasona (0,25 ou 1 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=4-5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)	
	FIG. A	FIG. B
Veículo	1,23 ± 0,03	1,38 ± 0,04
Dexametasona 0,25 mg/kg	1,25 ± 0,03	1,39 ± 0,03
Dexametasona 1 mg/kg	1,30 ± 0,04	1,39 ± 0,04



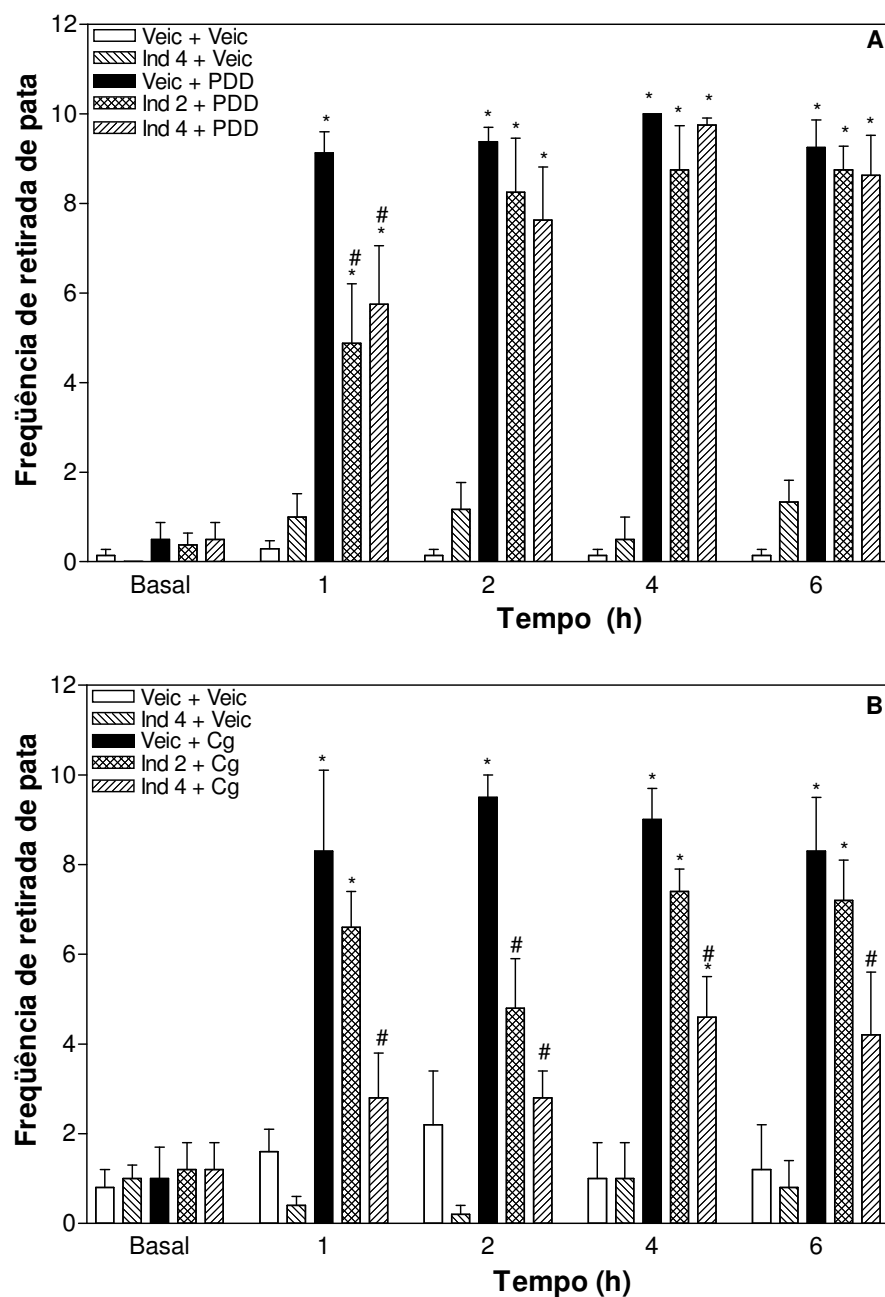
### 4.3 *Efeito da indometacina ou do rofecoxib sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina.*

A indometacina (2 ou 4 mg/kg), um antiinflamatório não-esteróide, ou o veículo (NaHCO<sub>3</sub> 0,5%) foram injetados por via i.p. 30 min antes da injeção do PDD ou da carragenina. A indometacina inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 14A) e pela carragenina (FIG. 14B). A inibição da alodínia induzida pelo PDD só foi observada na fase inicial (1 h). Entretanto, a inibição da alodínia induzida pela carragenina ocorreu por um período mais longo (6 h) e foi dose-dependente.

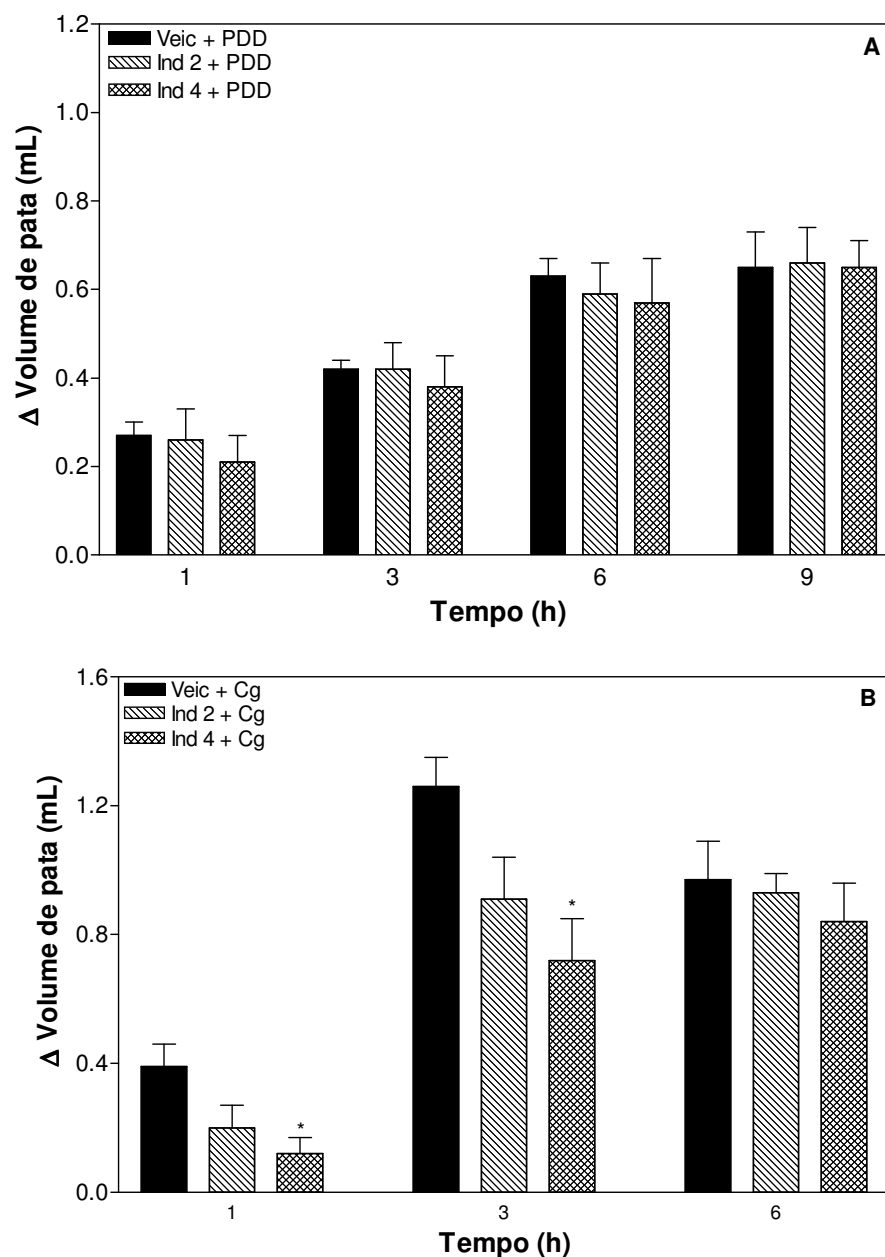
A injeção i.p. da indometacina não alterou o edema de pata induzido pelo PDD (FIG. 15A), mas inibiu, parcialmente, a resposta induzida pela carragenina até 3 h após a injeção do estímulo inflamatório (FIG. 15B).

Para investigar especificamente o envolvimento da COX-2 nessas respostas, um inibidor seletivo, rofecoxib (5 ou 10 mg/kg), foi administrado *per os* 1 h antes da injeção do PDD ou da carragenina. O rofecoxib não alterou a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 16A), mas aboliu a resposta induzida pela carragenina (FIG. 16B).

O rofecoxib inibiu parcialmente o edema de pata induzido pela carragenina somente 3 h após a injeção do estímulo inflamatório (FIG. 17). Como o edema induzido pelo PDD não foi reduzido pela indometacina, não foi avaliado o efeito do inibidor seletivo sobre essa resposta.

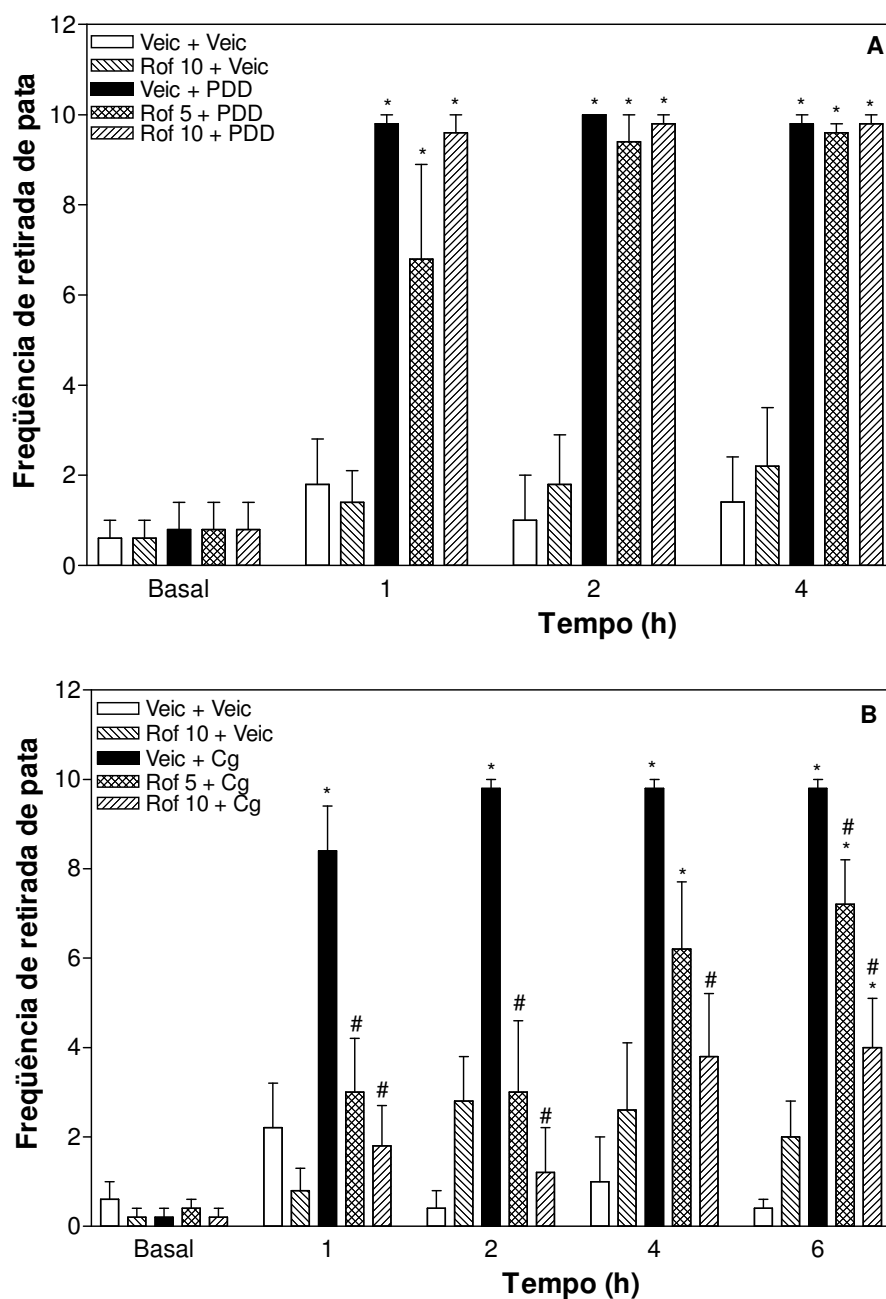


**Figura 14** – Efeito da indometacina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) ou veículo (NaHCO<sub>3</sub> 0,5%) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD ou carragenina, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=4-8).

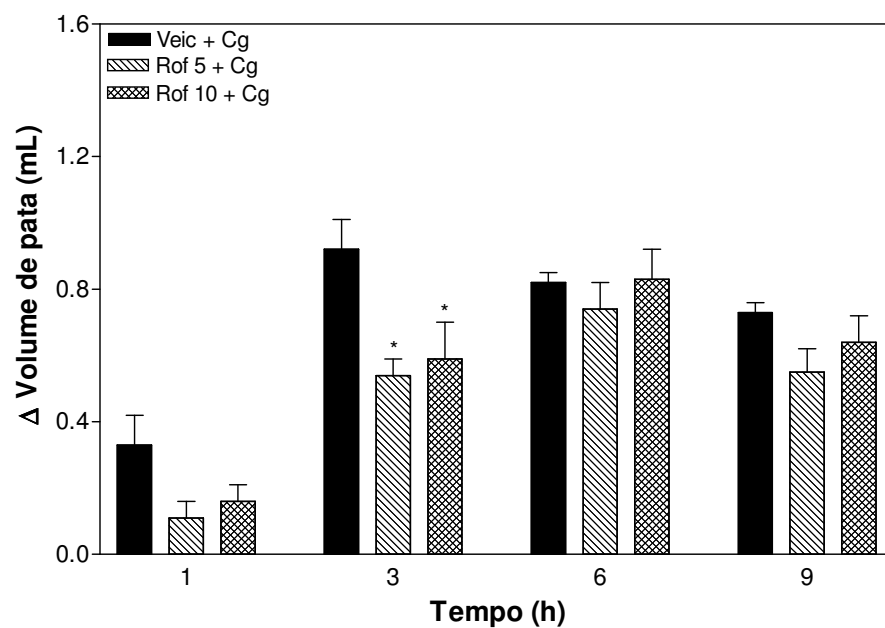


**Figura 15** – Efeito da indometacina sobre o edema de pata induzido pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Indometacina (2 ou 4 mg/kg; i.p.) ou veículo (NaHCO<sub>3</sub> 0,5%) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=4-5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)	
	FIG. A	FIG. B
Veículo	1,32 ± 0,06	1,46 ± 0,05
Indometacina 2 mg/kg	1,33 ± 0,06	1,45 ± 0,06
Indometacina 4 mg/kg	1,34 ± 0,09	1,47 ± 0,04



**Figura 16** – Efeito do rofecoxib sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Rofecoxib (5 ou 10 mg/kg; *per os*) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD ou carragenina, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=5).



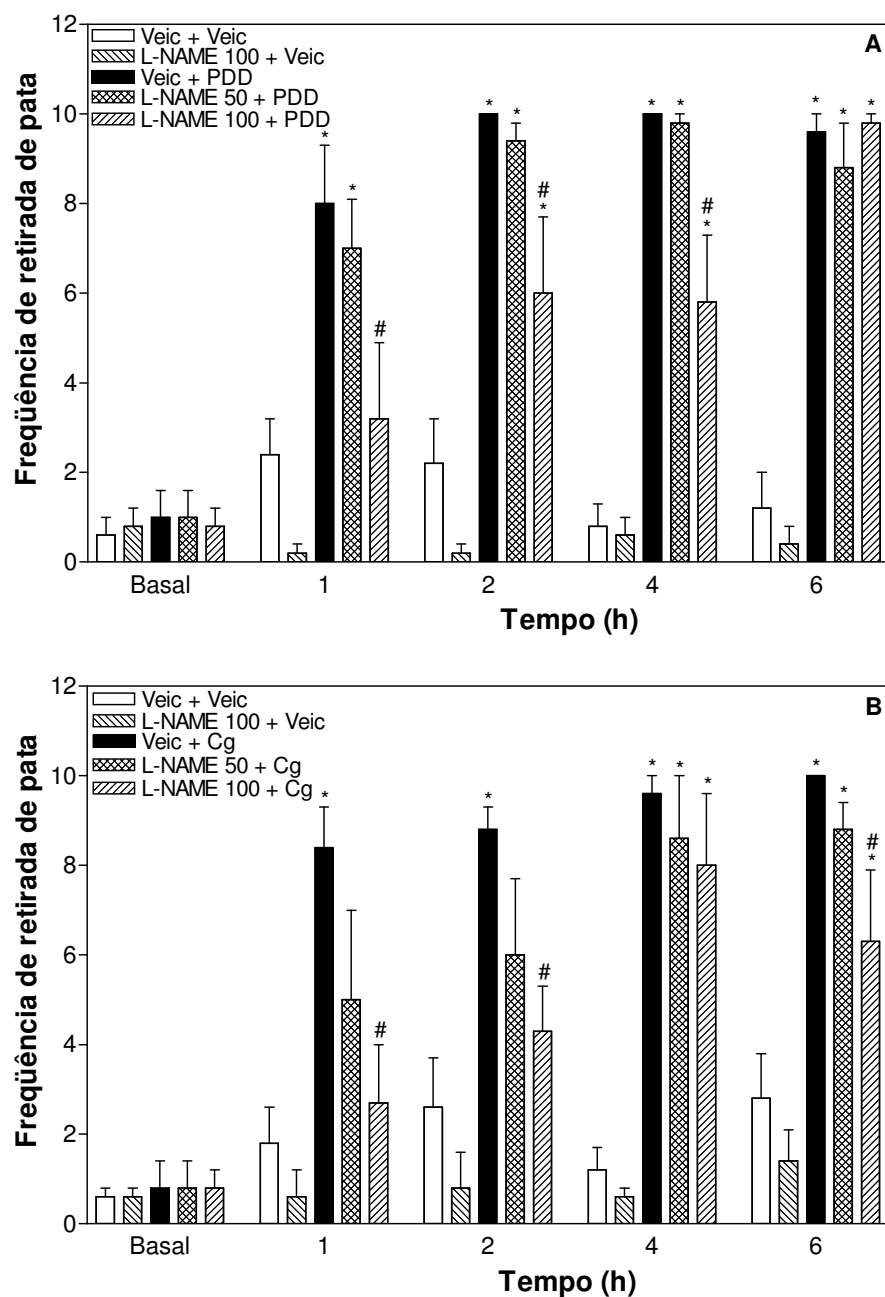
**Figura 17** – Efeito do rofecoxib sobre o edema de pata induzido pela carragenina. Rofecoxib (5 ou 10 mg/kg; *per os*) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)
<b>Veículo</b>	1,33 ± 0,03
<b>Rofecoxib 5 mg/kg</b>	1,33 ± 0,04
<b>Rofecoxib 10 mg/kg</b>	1,33 ± 0,06

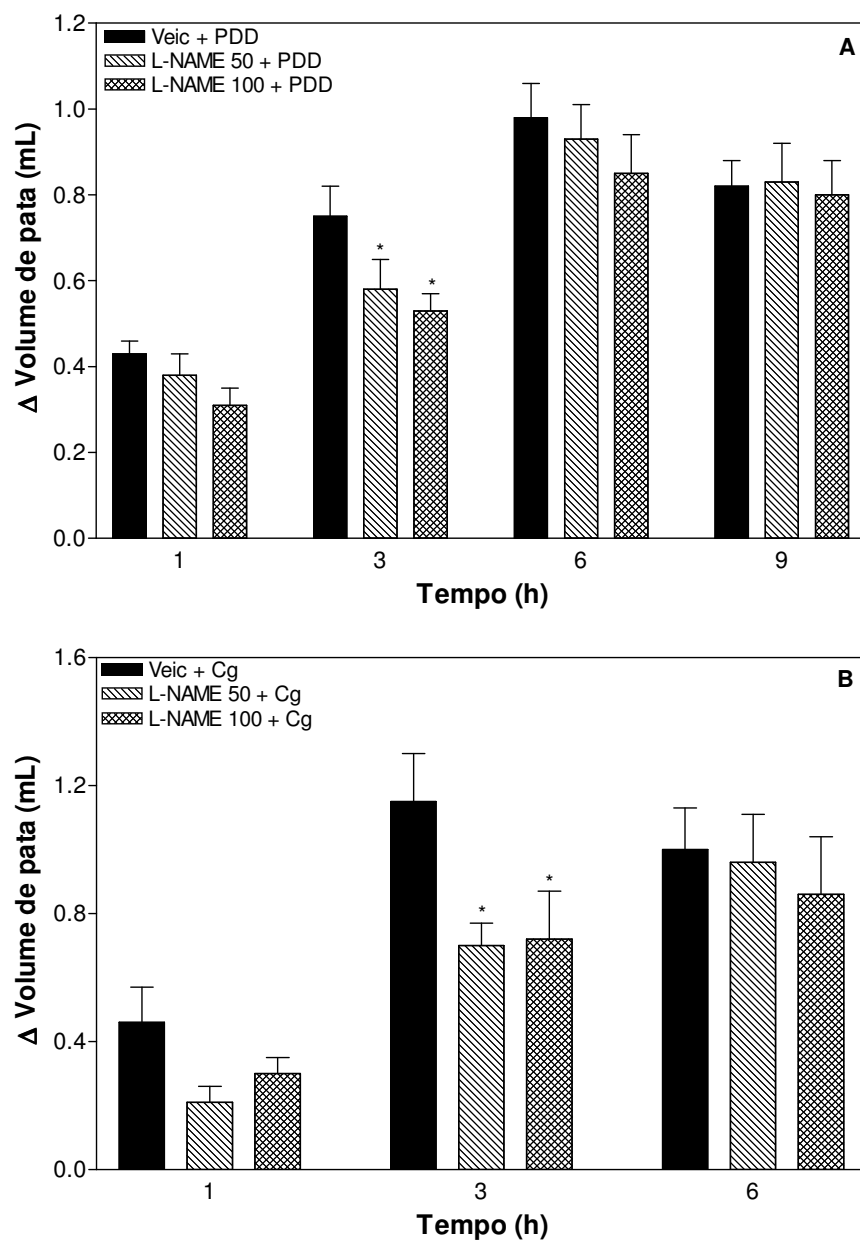
#### *4.4 Efeito do L-NAME sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina*

Para avaliar o papel do NO na alodínia mecânica e no edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina, o L-NAME (50 ou 100 mg/kg) foi administrado por via i.p. 30 min antes da injeção dos estímulos inflamatórios. Somente a maior dose do L-NAME reduziu a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 18A) ou pela carragenina (FIG. 18B). O L-NAME reduziu, de forma parcial, o edema induzido pelo PDD ou pela carragenina. As duas doses do inibidor reduziram o edema induzido pelo PDD (FIG. 19A) ou pela carragenina (FIG. 19B) somente 3 h após a injeção.

Como a indometacina e o L-NAME reduziram parcialmente a resposta nociceptiva induzida pelo PDD, um protocolo foi realizado para avaliar o efeito da injeção concomitante das duas drogas sobre a alodínia mecânica induzida por esse ativador da PKC. A indometacina ou o L-NAME reduziram parcialmente a alodínia mecânica induzida pelo PDD até 2 h após a injeção do estímulo inflamatório. Por outro lado, quando a indometacina e o L-NAME foram associados, a redução parcial permaneceu até pelo menos 6 h após a injeção do PDD (FIG. 20).



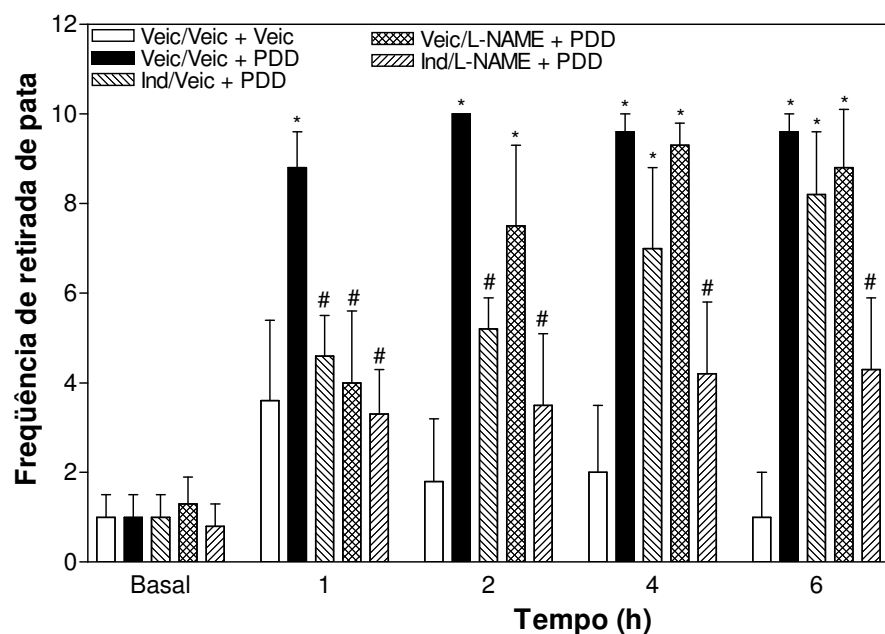
**Figura 18** – Efeito do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD ou carragenina, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=5-6).



**Figura 19 – Efeito do L-NAME sobre o edema de pata induzido pelo PDD (A) ou pela carragenina (B).** L-NAME (50 ou 100 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5-10).

Grupo	Volume basal de pata (mL)	
	FIG. A	FIG. B
Veículo	1,28 ± 0,03	1,25 ± 0,04
L-NAME 50 mg/kg	1,24 ± 0,04	1,25 ± 0,04
L-NAME 100 mg/kg	1,28 ± 0,03	1,27 ± 0,04





**Figura 20** – Efeito da indometacina + L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Indometacina (2 mg/kg; i.p.), L-NAME (100 mg/kg; i.p.), indometacina + L-NAME (2 mg/kg e 100 mg/kg, i.p.) ou veículo (NaHCO<sub>3</sub> 0,5% e salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo ou PDD (0,1 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=4-6).

#### *4.5 Efeito da metisergida ou prometazina sobre a alodínia mecânica e o edema de pata induzidos pelo PDD ou pela carragenina*

Para avaliar o papel da 5-HT e da histamina na alodínia mecânica e no edema induzidos pelo PDD ou pela carragenina, foi administrado por via i.p. a metisergida (2 ou 4 mg/kg), um antagonista dos receptores para 5-HT, ou a prometazina (5 ou 10 mg/kg), um antagonista dos receptores  $H_1$ , 60 min e 30 min antes da injeção dos estímulos inflamatórios, respectivamente.

A metisergida não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo PDD (FIG. 21A), mas inibiu parcialmente a alodínia mecânica induzida pela carragenina 2 h após a injeção do estímulo inflamatório (FIG. 21B). A metisergida inibiu parcialmente o edema de pata induzido pelo PDD, 3 h após a injeção desse ativador da PKC (FIG. 22A), e pela carragenina, ao longo de todo o curso temporal (FIG. 22B).

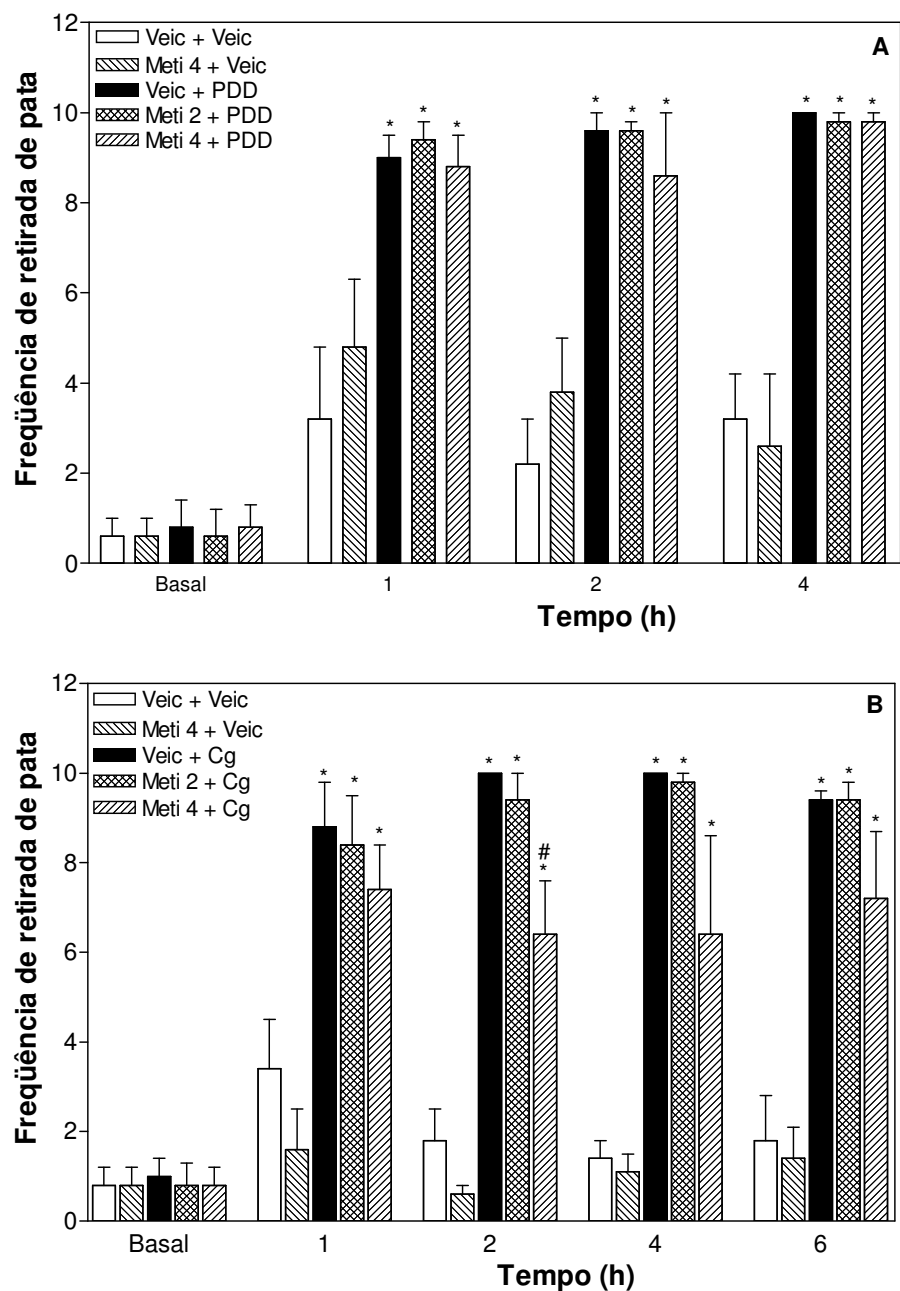
A prometazina não inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 23). Houve um aumento, estatisticamente significativo, da frequência de retirada da pata no grupo de animais que receberam injeção i.pl. da salina 30 min após a injeção i.p. da prometazina (10 mg/kg).

Para investigar se a injeção i.p. da prometazina induz sensibilização a um estímulo mecânico, foi realizado um protocolo no qual os animais receberam a injeção i.p. da prometazina (10 mg/kg) ou do veículo (salina) 30 min antes da injeção i.pl. da salina. A frequência de retirada das patas ipsi e contralateral foi determinada 1, 2 e 4 h após a injeção local da salina. A injeção i.p. da prometazina aumentou a frequência de retirada das patas ipsi e contralateral (FIG. 24). Uma vez que a prometazina induz sensibilização, o efeito dessa droga não foi avaliado no modelo de alodínia mecânica induzida pela carragenina.

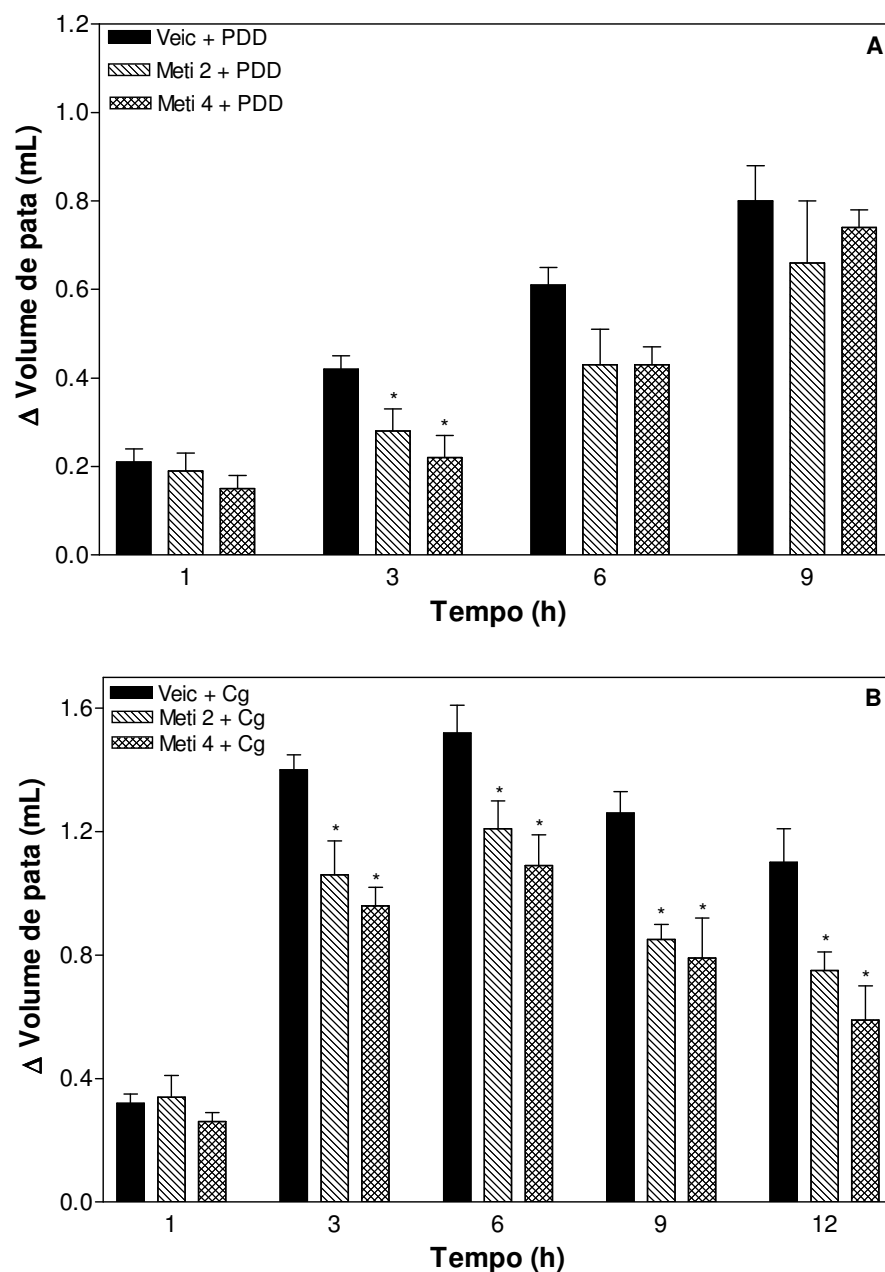
A injeção i.p. da prometazina (10 mg/kg), 30 min antes, reduziu o edema de pata induzido pelo PDD. Embora a tendência de inibição tenha sido clara, só foi observada inibição estatisticamente significativa 3 e 12 h após a injeção (FIG. 25A).

Por outro lado, a prometazina não inibiu o edema de pata induzido pela carragenina (FIG. 25B).

Também foi avaliado o efeito do cetotifeno (1 ou 4 mg/kg), um inibidor da desgranulação dos mastócitos e antagonista dos receptores  $H_1$ , sobre o edema induzido pelo PDD. O edema foi inibido parcialmente pela maior dose do cetotifeno 3 h após a injeção do PDD (FIG. 26).

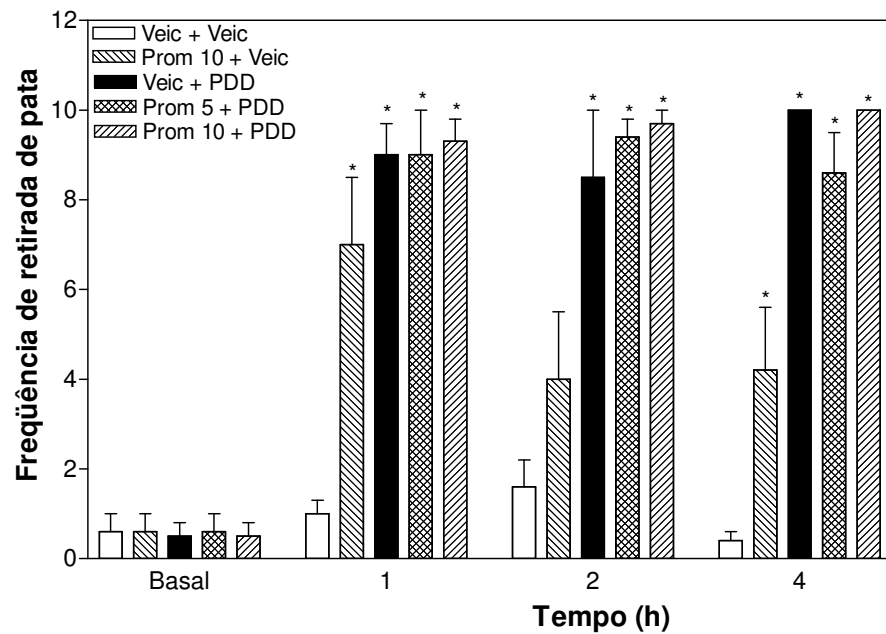


**Figura 21** – Efeito da metisergida sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD ou carragenina, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=5).

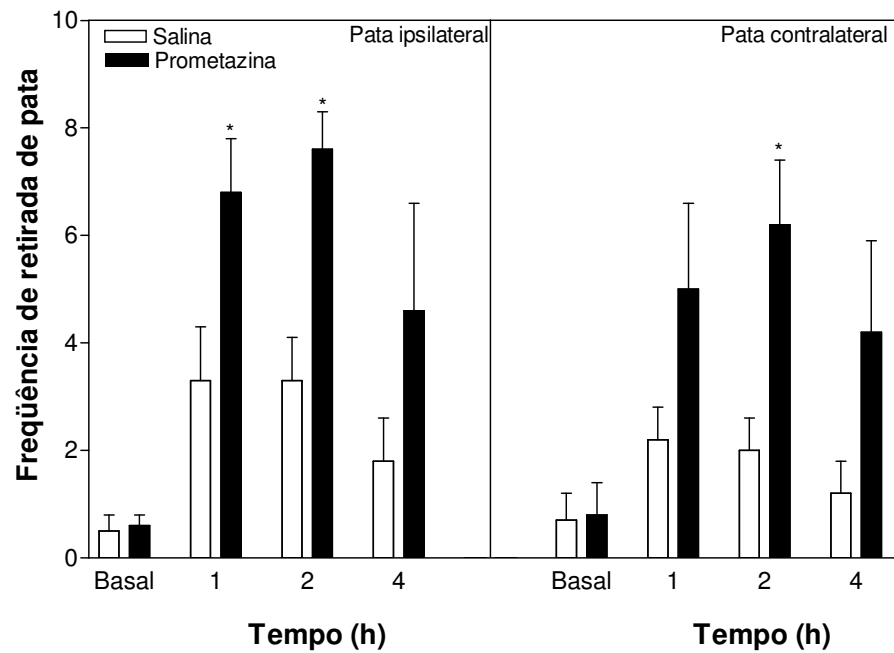


**Figura 22** – Efeito da metisergida sobre o edema de pata induzido pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Metisergida (2 ou 4 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 1 h antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5).

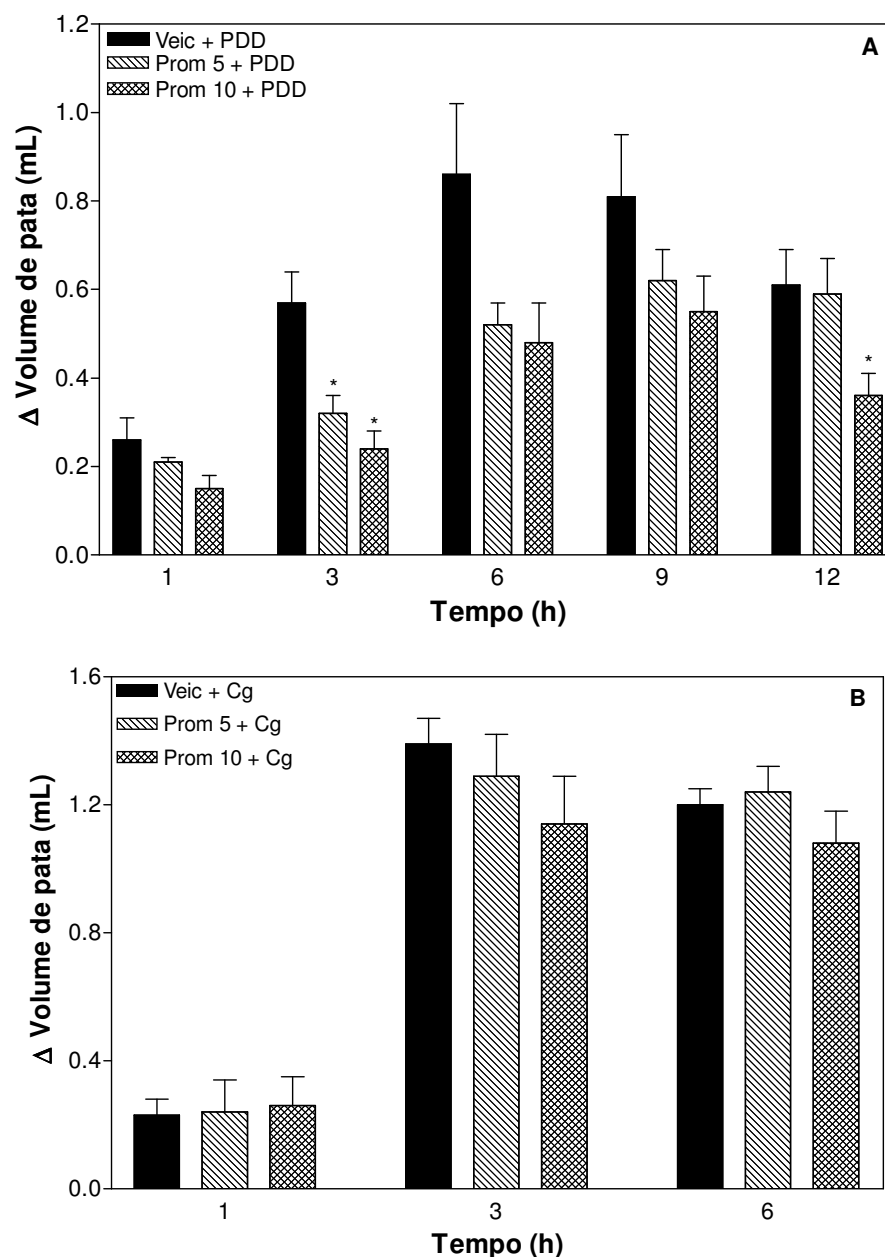
Grupo	Volume basal de pata (mL)	
	FIG. A	FIG. B
Veículo	1,34 ± 0,05	1,34 ± 0,04
Metisergida 2 mg/kg	1,33 ± 0,05	1,34 ± 0,05
Metisergida 4 mg/kg	1,34 ± 0,05	1,35 ± 0,06



**Figura 23** – Efeito da prometazina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Prometazina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo ou PDD (0,1 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5-6).



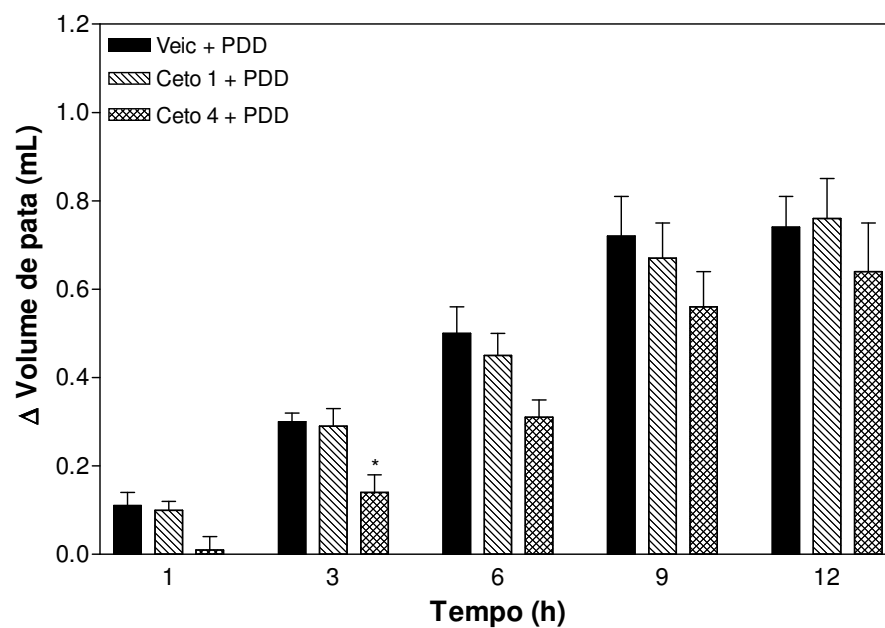
**Figura 24** – Efeito da prometazina sobre a freqüência de retirada da pata à estimulação mecânica. Prometazina (10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. da salina (50  $\mu$ L). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5-6).



**Figura 25** – Efeito da prometazina sobre o edema de pata induzido pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Prometazina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=4-5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)	
	FIG. A	FIG. B
Veículo	1,30 ± 0,03	1,39 ± 0,08
Prometazina 5 mg/kg	1,29 ± 0,03	1,38 ± 0,04
Prometazina 10 mg/kg	1,27 ± 0,03	1,37 ± 0,03





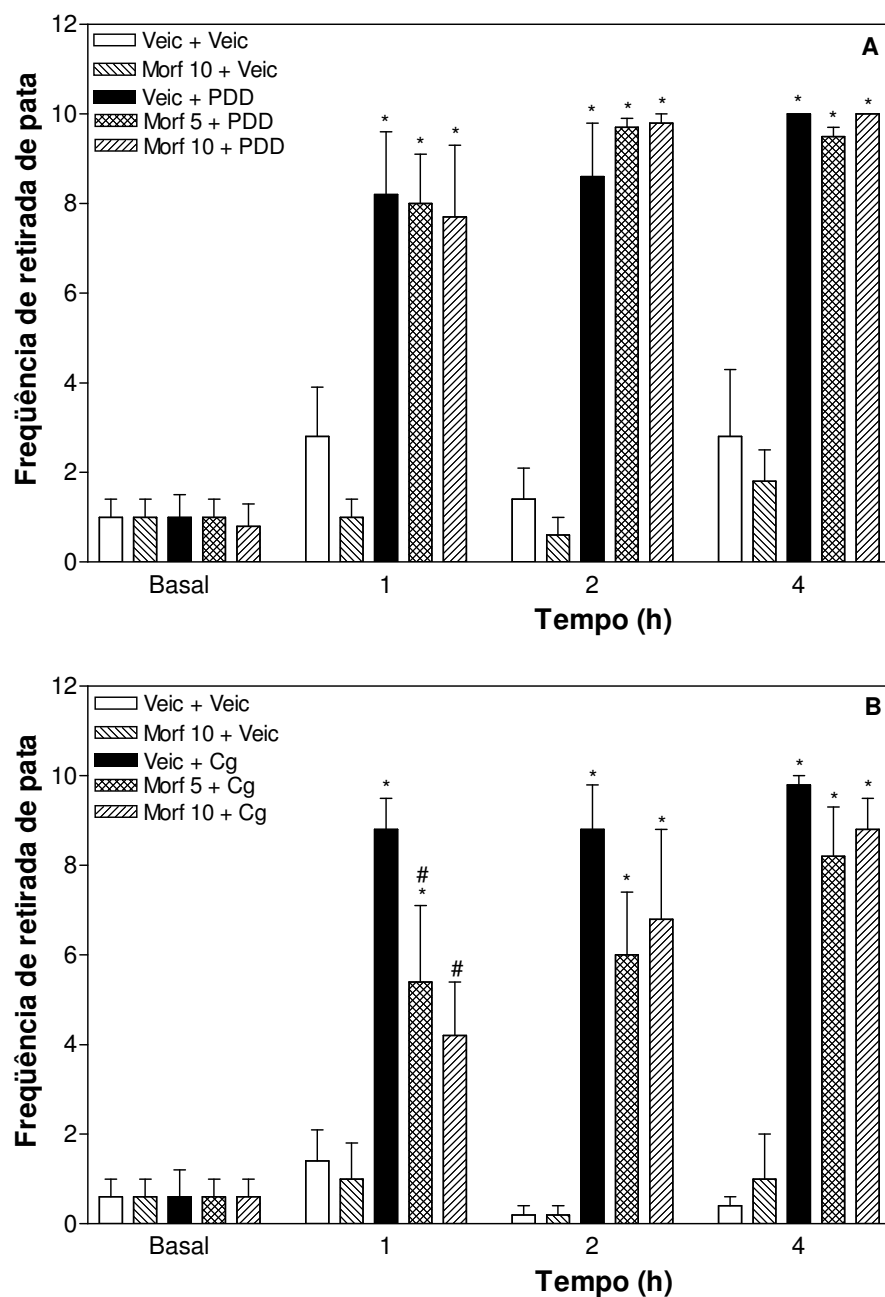
**Figura 26** – Efeito do cetotifeno sobre o edema de pata induzido pelo PDD. Cetotifeno (1 ou 4 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do PDD (0,1 µg). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=4-5).

Grupo	Volume basal de pata (mL)
Veículo	1,38 ± 0,06
Cetotifeno 1 mg/kg	1,38 ± 0,05
Cetotifeno 4 mg/kg	1,34 ± 0,03

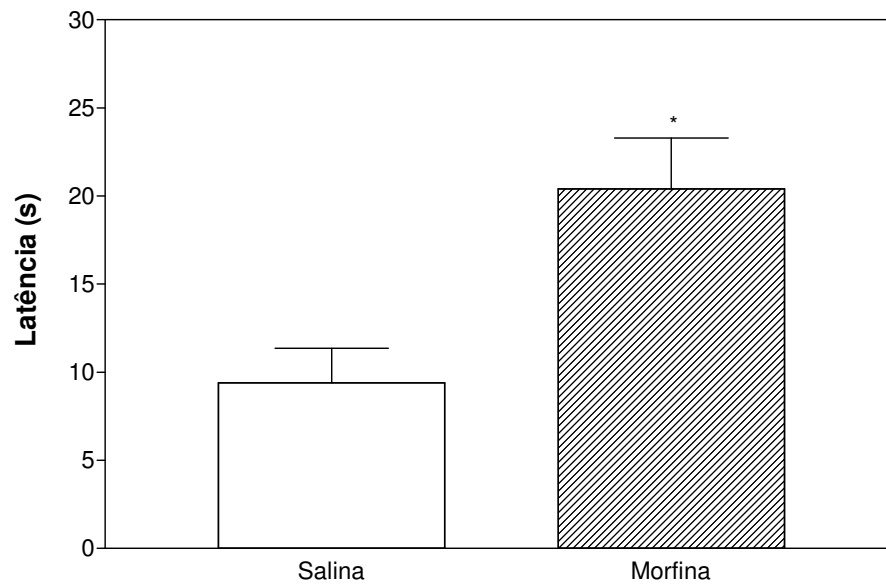
#### *4.6 Efeito da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina*

A administração i.p. da morfina (5 ou 10 mg/kg), 30 min antes, não inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD (FIG. 27A). Por outro lado, as mesmas doses da morfina inibiram parcialmente a alodínia mecânica induzida pela carragenina 1 h após a injeção do estímulo inflamatório (FIG. 27B).

Para confirmar a atividade antinociceptiva da morfina e validar os protocolos anteriores, foi avaliado o efeito desse analgésico opióide sobre a resposta nociceptiva no modelo da placa quente em camundongos. A injeção i.p. da morfina (10 mg/kg), 30 min antes, aumentou de forma estatisticamente significativa a latência para a apresentação do comportamento nociceptivo (FIG. 28).



**Figura 27** – Efeito da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD (A) ou pela carragenina (B). Morfina (5 ou 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo, PDD (0,1 µg) ou da carragenina (500 µg). \* e # indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com PDD ou carragenina, respectivamente,  $P < 0,05$  (n=5-6).

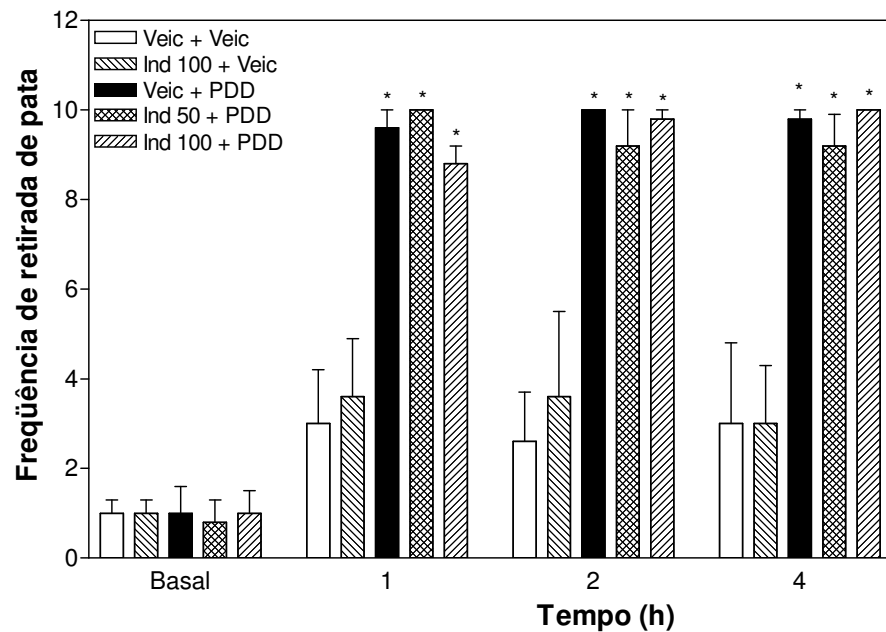


**Figura 28** – Efeito da morfina sobre a resposta nociceptiva no modelo da placa quente em camundongos. Morfina (10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foram administrados 30 min antes do teste. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=10).

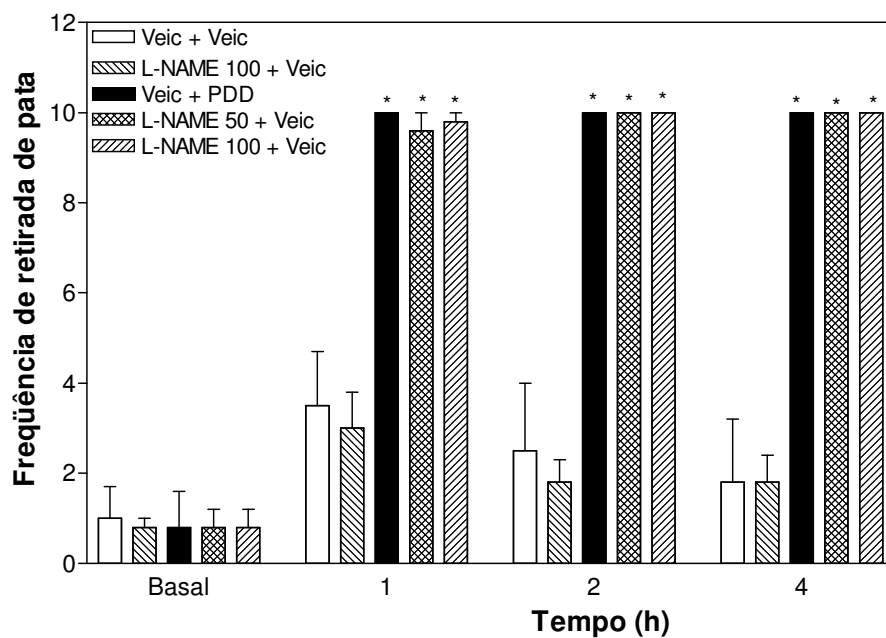
#### *4.7 Efeito da injeção i.pl. da indometacina ou do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD*

A indometacina e o L-NAME, quando administrados por via i.p., reduziram parcialmente a fase inicial da alodínia mecânica induzida pelo PDD. Para avaliar se esse efeito resultou de uma ação local, a indometacina (50 ou 100 µg/50 µL) ou o L-NAME (50 ou 100 µg/50 µL) foram injetados por via i.pl., 30 min antes da injeção i.pl. do PDD. A alodínia mecânica induzida pelo PDD não foi inibida pela indometacina (FIG. 29) ou pelo L-NAME (FIG. 30).

O resumo dos resultados desse estudo está representado nas Tabelas 1 e 2.



**Figura 29** – Efeito da injeção i.pl. da indometacina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Indometacina (50 ou 100  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{L}$ ) ou veículo ( $\text{NaHCO}_3$  0,5%, 50  $\mu\text{L}$ ) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo (DMSO 0,2%, 50  $\mu\text{L}$ ) ou PDD (0,1  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{L}$ ). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5-6).



**Figura 30** – Efeito da injeção i.pl. do L-NAME sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD. L-NAME (50 ou 100  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{L}$ ) ou veículo (salina, 50  $\mu\text{L}$ ) foram administrados 30 min antes da injeção i.pl. do veículo (DMSO 0,2%, 50  $\mu\text{L}$ ) ou PDD (0,1  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{L}$ ). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle,  $P < 0,05$  (n=5-6).

**Tabela 1** – Efeitos de diferentes drogas sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD e pela carragenina.

Drogas	Resposta nociceptiva	
	Carragenina	PDD
<b>Dexametasona</b>	↔	↔
<b>Indometacina</b>	↓	↓
<b>Rofecoxib</b>	↓	↔
<b>L-NAME</b>	↓	↓
<b>Metisergida</b>	↓	↔
<b>Prometazina</b>	NR	↔
<b>Morfina</b>	↓	↔
<b>Indometacina i.pl.</b>	NR	↔
<b>L-NAME i.pl.</b>	NR	↔

↓: inibição

↔: ausência de efeito

NR: não realizado

**Tabela 2** - Efeitos de diferentes drogas sobre o edema de pata induzido pelo PDD e pela carragenina.

Drogas	Edema	
	Carragenina	PDD
<b>Dexametasona</b>	↓	↓
<b>Indometacina</b>	↓	↔
<b>Rofecoxib</b>	↓	NR
<b>L-NAME</b>	↓	↓
<b>Metisergida</b>	↓	↓
<b>Prometazina</b>	↔	↓
<b>Cetotifeno</b>	NR	↓

↓: inibição

↔: ausência de efeito

NR: não realizado



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a injeção i.pl. do PDD, um ativador da PKC, ou da carragenina induz alodínia mecânica e edema de pata em ratos. Os resultados indicam que múltiplos mediadores podem estar envolvidos na resposta nociceptiva e no edema de pata induzidos pela carragenina ou pelo PDD. Além disso, é possível observar que os mediadores inflamatórios investigados podem influenciar de modo diferente o desenvolvimento dos dois eventos observados e que as respostas induzidas pelo PDD e pela carragenina resultam da ação de mediadores distintos.

Os primeiros resultados apresentados nesse estudo demonstraram os efeitos da ativação direta da PKC. Observou-se que a injeção periférica do PDD, mas não do análogo inativo 4 $\alpha$ -PDD, induz alodínia mecânica de longa duração. Esse resultado, associado à observação de que queleritrina, um inibidor da PKC, inibe a alodínia térmica induzida por PDD (SOUZA *et al.*, 2002), permite sugerir que a resposta induzida por esse éster de forbol é dependente da ativação da PKC. A alodínia induzida pelo PDD apresentou menor duração quando comparada com aquela induzida pela carragenina. Duas ações distintas podem contribuir para a resposta nociceptiva induzida pelo ativador da PKC. A primeira é a ativação direta da PKC em nociceptores e a segunda é a ativação da PKC em células não neuronais presentes no local da injeção.

Quanto à primeira ação, foi demonstrado que os ativadores da PKC induzem alterações fenotípicas marcantes dos nociceptores. Schepelmann *et al.* (1993) demonstraram que o PDBu causa excitação neuronal e sensibilização a estímulos mecânicos, enquanto Leng *et al.* (1996) demonstraram que esse ativador da PKC induz aumento significativo da atividade basal de nociceptores polimodais e da resposta desses ao calor. Esses estudos, demonstrando que ésteres de forbol induzem excitação neuronal e sensibilização a estímulos térmicos e mecânicos, dão suporte à idéia de que a PKC ativa diretamente os nociceptores. Estudos nos quais a PKC foi quantificada por meio de técnica da 'western blotting' em neurônios do GRD demonstraram a presença dessa enzima em mais de 90% dos neurônios de pequeno diâmetro, característicos dos nociceptores (CESARE *et al.*, 1999; KHASAR

*et al.*, 1999). Mais importante do que esse aspecto, a imunorreatividade para a PKC- $\epsilon$  foi demonstrada em uma localização característica das terminações dos nociceptores, a junção entre a derme e a epiderme (KHASAR *et al.*, 1999).

Por outro lado, há evidências que sustentam um mecanismo não neuronal para a resposta nociceptiva induzida pelo PDD. A ativação da PKC induz produção de mediadores inflamatórios que contribuem para a ativação ou sensibilização dos nociceptores. As isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$ /I e  $\mu$  da PKC foram identificadas em macrófagos (OH *et al.*, 1999; VALLEDOR *et al.*, 2000), sendo que, nessas células, a ativação da enzima está associada ao aumento da produção de PGs (LIN & CHEN, 1999). De forma semelhante, Jacobson *et al.* (1995) demonstraram que macrófagos de camundongos produzem PGE<sub>2</sub> após tratamento com o PMA, um efeito que foi inibido pelo Gö 6850, um inibidor da PKC. A ativação da PKC também pode contribuir para a produção do NO pelos macrófagos, uma vez que inibidores dessa enzima atenuam a expressão da iNOS induzida pelo LPS (PAUL *et al.*, 1995; MOMOSE *et al.*, 2000). A produção das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , (ST-DENIS *et al.*, 1998), IL-6 (YAMAKI & OHUCHI, 1999) e TNF- $\alpha$  (BAUMGARTNER *et al.*, 1996; ST-DENIS *et al.*, 1998; CORSINI *et al.*, 1999) pelos macrófagos também depende da ativação da PKC.

Os resultados do presente estudo também demonstraram que o PDD induz edema de pata. De forma semelhante ao que foi observado no modelo de alodínia mecânica, o edema de pata não foi observado quando se injetou o análogo inativo 4 $\alpha$ -PDD, o que, mais uma vez, indica a especificidade da resposta observada. O edema de pata induzido pelo PDD apresentou um curso temporal semelhante àquele induzido pela carragenina, embora sua magnitude, de uma forma geral, tenha sido menor. Outro ativador da PKC, o PMA, quando aplicado na orelha de camundongos, também induz edema (RICKINGER *et al.*, 1994), uma resposta que pode estar associada ao aumento da permeabilidade vascular induzida pelos ésteres de forbol (OHUCHI *et al.*, 1987; QU *et al.*, 1990).

Com o objetivo de determinar os possíveis mediadores envolvidos na alodínia mecânica e no edema induzidos pelo PDD, o efeito de várias drogas sobre essas

respostas foi avaliado. Além disso, os efeitos das mesmas drogas foram avaliados nos modelos de alodínia mecânica e edema de pata induzidos pela carragenina, com o objetivo de comparar as respostas induzidas por um ativador de PKC com aquelas induzidas por um estímulo inflamatório não específico.

Inicialmente, foi investigado o efeito da dexametasona, um antiinflamatório esteróide. Dexametasona inibiu de forma marcante o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina durante todo o curso temporal, mas não alterou a alodínia mecânica induzida por esses dois estímulos inflamatórios. A ausência de efeito inibitório sobre a alodínia mecânica não pode ser atribuída ao uso de doses inadequadas da dexametasona, uma vez que as mesmas doses aboliram o edema de pata induzido pelo PDD ou pela carragenina. O efeito dos antiinflamatórios esteróides sobre a resposta nociceptiva induzida por diferentes estímulos inflamatórios não é tão marcante quanto àquele sobre o edema. Nos estudos publicados, observa-se uma inibição parcial da resposta nociceptiva após a administração de doses mais elevadas do que aquelas usadas no presente estudo (BRESSAN *et al.*, 2003; HUNSKAAR & HOLE, 1987; KEHL *et al.*, 2000; VINEGAR *et al.*, 1987). Quanto ao edema induzido pela carragenina em ratos e camundongos, vários estudos demonstram que essa resposta é inibida amplamente pelos antiinflamatórios esteróides (LEVY, 1969; WINTER *et al.*, 1962).

Vários mediadores inflamatórios que podem contribuir para o edema induzido pelos ésteres de forbol têm a sua produção inibida pelos antiinflamatórios esteróides. Essas drogas inibem a produção de citocinas inflamatórias ou de mRNA para esses mediadores em culturas de leucócitos estimulados pelo PMA (LEE *et al.*, 1988; WHELAN *et al.*, 1999). Mastócitos de ratos tratados com a associação de TPA e ionóforo de cálcio liberam histamina e AA, sendo esse efeito inibido pelo pré-tratamento com hidrocortisona (HEIMAN & CREWS, 1985). Antiinflamatórios esteróides também inibem a expressão do gene da COX-2 induzida pelo TPA em queratinócitos de ratos (WANG *et al.*, 2001). Além disso, De Young *et al.* (1989) demonstraram que o TPA, aplicado na orelha de camundongos, induz edema e aumento da atividade da mieloperoxidase, respostas que são inibidas pelos antiinflamatórios esteróides. Assim, em função do amplo mecanismo de ação desses antiinflamatórios, não é possível estabelecer quais mediadores são importantes para

o desenvolvimento do edema de pata induzido pelo PDD quando se analisa apenas o resultado obtido no protocolo com dexametasona.

Para investigar o papel de eicosanóides derivados da via da ciclooxygenase nessas respostas, indometacina, um antiinflamatório não-esteróide, foi usada. Esse inibidor não seletivo da COX reduziu parcialmente, porém de forma significativa, a alodínia na primeira hora após a injeção do PDD, mas não alterou o edema. Esses resultados permitem sugerir que os eicosanóides, mediadores inflamatórios cuja produção é inibida pelos antiinflamatórios não-esteróides (VANE, 1971), apresentam um papel distinto no desenvolvimento do edema e da nocicepção induzidos pelos ativadores da PKC, ou seja, contribuem para o desenvolvimento da resposta nociceptiva, mas não do edema. A inibição parcial da resposta nociceptiva induzida pelo PDD nos animais tratados com indometacina pode ter relação com alguns resultados de estudos *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que a produção de vários eicosanóides pelos macrófagos de ratos estimulados pelo TPA é atenuada pela indometacina (MARSHALL, 1988). Além disso, esse antiinflamatório não-esteróide inibiu a produção da PGE<sub>2</sub> induzida pela injeção do TPA no dorso de ratos (OHUCHI *et al.*, 1987). De modo semelhante, a ausência de efeito inibitório da indometacina sobre o edema induzido pelo PDD pode ter relação com outros resultados. Inibidores da COX atenuam o aumento da atividade da mieloperoxidase, mas não o edema, induzido pela aplicação do TPA na orelha de camundongos (DE YOUNG *et al.*, 1989).

O fato da indometacina inibir a fase inicial da resposta nociceptiva indica que eicosanóides produzidos na pata ou no sistema nervoso central podem ser importantes para a fase inicial da alodínia mecânica induzida pelos ativadores da PKC. Poderia ser especulado que a redução da concentração plasmática da indometacina em função da sua biotransformação explicaria a ausência de inibição da fase tardia da resposta nociceptiva. Entretanto, essa possibilidade é pouco provável, uma vez que as mesmas doses desse antiinflamatório inibiram a alodínia mecânica induzida pela carragenina por um período bem mais longo.

O pré-tratamento com a indometacina inibiu de forma marcante a alodínia mecânica induzida pela carragenina e inibiu parcialmente a fase inicial do edema de pata

induzido por esse estímulo inflamatório. Vários estudos dão suporte ao envolvimento dos eicosanóides derivados da via da COX na resposta induzida pela carragenina. Winter *et al.* (1962), em seu estudo original, demonstraram que a fenilbutazona e o ácido acetilsalicílico inibem o edema de pata induzido pela carragenina. Outro antiinflamatório não-esteróide, a indometacina, inibe parcialmente o edema de pata induzido pela dose de 100 µg da carragenina. Entretanto, a magnitude da inibição induzida pela indometacina foi muito menor quando a dose da carragenina foi aumentada para 500 µg. Além disso, Tonussi & Ferreira (1992) demonstraram que a incapacitação articular induzida pela carragenina em ratos é inibida pela indometacina. Esses resultados, juntamente com outros publicados, indicam que a carragenina induz alodínia mecânica e edema de pata por meio de um mecanismo dependente da ativação da COX e da produção de eicosanóides (KEHL *et al.*, 2000; LORENZETTI & FERREIRA, 1985; VINEGAR *et al.*, 1987).

Embora os resultados anteriores indiquem que os eicosanóides devem contribuir para a fase inicial da resposta nociceptiva induzida pelo PDD, não é possível determinar qual isoforma da COX é importante para a sua produção, uma vez que a indometacina é um inibidor não seletivo dessa enzima. Com o objetivo de investigar esse aspecto, foi avaliado o efeito do rofecoxib, um inibidor seletivo da COX-2, sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Uma vez que o rofecoxib não inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD, é possível que essa resposta esteja associada à ativação da COX-1. Poderia ser especulado que as doses do rofecoxib não tenham sido suficientes para induzir o efeito antinociceptivo. Entretanto, as mesmas doses inibiram a alodínia mecânica induzida pela carragenina. A resposta induzida pelo PDD de forma independente da COX-2 apresenta relação com o estudo de Levine (1996), no qual foi demonstrado que em hepatócitos tratados com o TPA ocorre aumento da produção da PGI<sub>2</sub> mediada pela COX-1, mas não pela COX-2. No entanto, outro estudo demonstrou que a ativação da PKC pelos ésteres de forbol aumenta a expressão do gene para COX-2. Wang *et al.* (2001) demonstraram que queratinócitos de camundongos tratados com o TPA apresentam uma rápida liberação do AA e um aumento da expressão do gene da COX-2. Essas respostas são maiores em queratinócitos de camundongos transgênicos que têm a

expressão para a PKC $\alpha$  aumentada. Essas diferenças, provavelmente, são explicadas pelos diferentes tipos de células usadas nos estudos.

Por outro lado, a alodínia mecânica induzida pela carragenina foi inibida pelo rofecoxib. Vários estudos demonstraram que a COX-2 é importante para a resposta nociceptiva e o edema induzidos pela carragenina (DIRIG *et al.*, 1998; IBUKI *et al.*, 2003; HAY & de BELLEROUCHE, 1998; SHIN *et al.*, 2004; YAMAMOTO & NOZAKI-TAGUCHI, 1996 e 1997). Zhang *et al.* (1997) demonstraram que os inibidores seletivos da COX-2 reduzem a hiperalgesia e o edema induzidos pela carragenina e Nantel *et al.* (1999) demonstraram que a injeção da carragenina induz hiperalgesia e edema de pata e também aumento da expressão do gene da COX-2 e do conteúdo de PGE<sub>2</sub>.

O papel do NO no edema de pata e na alodínia mecânica induzidos pelo PDD e pela carragenina também foi avaliado. Muitos estudos demonstraram que os ativadores da PKC e vários mediadores inflamatórios aumentam a atividade da NOS, resultando em um aumento da síntese do NO. Esse mediador, por sua vez, contribui para o desenvolvimento da resposta nociceptiva e do edema induzidos por diferentes estímulos inflamatórios (APPLETON *et al.*, 1996). No presente estudo, o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, inibiu parcialmente a fase inicial do edema de pata e da alodínia mecânica induzidos pelo PDD e pela carragenina.

Sustentação aos resultados do presente estudo são facilmente encontrados. A ativação da PKC pelos ésteres de forbol aumenta a transcrição do gene da eNOS humana (LI *et al.*, 1998) e a produção do NO (YAMASHITA *et al.*, 2003). De forma semelhante, muitos mediadores inflamatórios cuja produção é estimulada pelos ativadores da PKC e pela carragenina também estimulam a produção do NO (EBERHARDT *et al.*, 1998; GELLER *et al.*, 1995; IGNJATOVIC *et al.*, 2004; STADLER *et al.*, 1991). Um resultado que tem relação mais próxima com o efeito inibitório do L-NAME sobre o edema de pata induzido pelo PDD é a demonstração de que a inibição da síntese do NO reduz o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo PDBu (RAMIREZ *et al.*, 1996).

Quanto ao efeito inibitório do L-NAME sobre o edema de pata induzido pela carragenina, há vários estudos que dão suporte direto aos resultados do presente estudo. Ialenti *et al.* (1992) demonstraram que o L-NAME e o L-NMMA inibem o extravasamento de plasma e o edema de pata induzidos pela carragenina. A administração prolongada do L-NAME também inibe edema de pata induzido pela carragenina, sendo esse efeito uma consequência da diminuição do fluxo sanguíneo e não da permeabilidade vascular (MEDEIROS *et al.*, 1995).

O efeito inibitório do L-NAME sobre a resposta nociceptiva induzida pelo PDD ou pela carragenina também pode ser associado a resultados de outros estudos. Inibidores da NOS diminuem a resposta nociceptiva induzida por diferentes estímulos inflamatórios (DOURSOUT *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2002; TEDESCO *et al.*, 2002). O NO pode modular a resposta nociceptiva atuando tanto nas terminações periféricas dos nociceptores quanto no SNC. Quanto à ação do NO no SNC, principalmente na medula espinhal, observa-se um papel pró-nociceptivo (INOUE *et al.*, 1997; LUI & LEE, 2004; OSBORNE & CODERRE, 1999; PARK *et al.*, 2000). Entretanto, o papel do NO na modulação periférica da resposta nociceptiva ainda é motivo de controvérsias. Há estudos demonstrando um papel pró-nociceptivo (DOURSOUT *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2002; TAO *et al.*, 2003, TEDESCO *et al.*, 2002) e outros demonstrando um papel antinociceptivo (DUARTE & FERREIRA, 1992; PRADO *et al.*, 2002; VIVANCOS *et al.*, 2003). Embora o L-NAME tenha induzido efeito antinociceptivo no presente estudo, não é possível estabelecer o seu local de ação, uma vez que a administração i.p. das doses desse inibidor usadas no presente estudo pressupõe uma ação sistêmica.

Uma vez que os inibidores da síntese do NO e dos eicosanóides inibem parcialmente a nocicepção induzida pelo PDD e que vários estudos indicam a existência de uma interação entre esses mediadores, avaliou-se o efeito da associação L-NAME e indometacina sobre essa resposta. Conforme observado, a injeção da indometacina ou do L-NAME, isoladamente, inibe, de forma parcial, a fase inicial da alodínia mecânica induzida pelo éster de forbol. No entanto, quando esses dois inibidores foram injetados em associação, a inibição da resposta nociceptiva foi observada por um período mais longo. Esse resultado indica que, durante a resposta

nociceptiva induzida pelo PDD, ocorre uma interação positiva entre o NO e os eicosanóides.

Suporte à hipótese mencionada é encontrado em vários estudos (CHEN & LEVINE, 1999; SALVEMINI *et al.*, 1996). Recentemente, Toriyabe *et al.* (2004) demonstraram que o NO ativa a COX-1 na fase inicial da resposta inflamatória induzida pela carragenina e regula a expressão da COX-2 na fase tardia, resultando na produção da PGE<sub>2</sub> e da PGI<sub>2</sub> no local da inflamação, o que pode contribuir para a exacerbação do processo inflamatório.

Na seqüência, investigou-se o papel das aminas vasoativas no edema de pata e na alodínia mecânica induzidos pelo PDD. A metisergida, um antagonista não seletivo dos receptores para a 5-HT, inibiu de forma parcial o edema da pata, mas não a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Existem estudos demonstrando que a 5-HT está envolvida nas alterações vasculares induzidas pelos ésteres de forbol. Ohuchi *et al.* (1987) demonstraram que a metisergida inibe o aumento da permeabilidade vascular induzido pela injeção do TPA no dorso de ratos. Esse efeito foi observado na fase inicial da resposta, mas não 4 h após a injeção do TPA. De Young *et al.* (1989) demonstraram que os antagonistas serotoninérgicos não inibem de forma ampla o edema induzido pela aplicação do TPA na orelha de camundongos. Apesar desses resultados indicarem que ésteres de forbol induzem liberação da 5-HT, esse mediador, isoladamente, parece não ser importante para a alodínia mecânica induzida pelo PDD e apenas contribui parcialmente para o edema de pata induzido por esse estímulo inflamatório.

Por outro lado, a metisergida inibiu parcialmente a alodínia mecânica e o edema induzidos pela carragenina. Os resultados obtidos estão em acordo com aqueles do estudo publicado por Eschaliier *et al.* (1989), no qual foi demonstrado que os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> diminuem a hiperalgesia induzida pela injeção da carragenina.

O papel da histamina nas respostas induzidas pelo PDD também foi avaliado. A prometazina, um antagonista H<sub>1</sub>, não inibiu a alodínia mecânica induzida pelo PDD. Entretanto, esse antagonista *per se* aumentou a freqüência da retirada de pata ao



estímulo mecânico. Apesar da existência de estudos demonstrando o efeito antinociceptivo dos antagonistas H<sub>1</sub> em diferentes modelos experimentais (PARADA *et al.*, 2001; RUMORE & SCHLICHTING, 1985), Paalzow & Paalzow (1985) demonstraram que a injeção de doses reduzidas (1,25-5 mg/kg, s.c.) e doses elevadas (20-40 mg/kg, s.c.) da prometazina induzem facilitação e inibição, respectivamente, da resposta nociceptiva no teste da vocalização em ratos. Assim, nenhuma conclusão pode ser estabelecida sobre o papel da histamina na resposta nociceptiva induzida pelo PDD a partir da análise dos resultados obtidos nesse protocolo.

Por outro lado, a prometazina inibiu parcialmente o edema de pata induzido pelo PDD. Alguns estudos avaliaram a interação entre os ésteres de forbol e a histamina. Ohuchi *et al.* (1987) demonstraram que a pirilamina, um antagonista H<sub>1</sub>, atenua o aumento da permeabilidade vascular induzida pela injeção do TPA no dorso de ratos. Esse resultado está diretamente associado à observação de que o TPA induz a liberação da histamina pelos mastócitos de maneira concentração-dependente (CANTWELL & FOREMAN; 1986). Também foi demonstrado que os ésteres de forbol induzem pequena liberação da histamina por diferentes células *in vitro*, uma resposta que é aumentada na presença de um ionóforo de cálcio (CHAKRAVARTY, 1990; GROSMAN & NIELSEN, 1988; SAGI-EISENBERG *et al.*, 1985). Esses resultados indicam que a injeção do PDD pode induzir liberação da histamina na pata dos ratos, o que contribui para o desenvolvimento do edema. Com o objetivo de melhor investigar o papel das aminas vasoativas no edema de pata induzido pelo PDD, o efeito do cetotifeno sobre essa resposta foi avaliado. O cetotifeno, um inibidor da desgranulação dos mastócitos e antagonista H<sub>1</sub>, também inibiu parcialmente o edema induzido por esse ativador da PKC, o que fornece suporte adicional ao envolvimento das aminas vasoativas originárias dos mastócitos.

Embora a prometazina tenha inibido parcialmente o edema de pata induzido pelo PDD, tal efeito não foi observado quando o edema foi induzido pela carragenina. Winter *et al.* (1962) demonstraram que altas doses da ciproheptadina também não inibem o edema de pata induzido pela carragenina. Posteriormente, outros autores observaram que os antagonistas H<sub>1</sub> e da 5-HT não reduzem o edema de pata (DAMAS & REMACLE-VOLON, 1986; STOCHLA & MASLINSKI, 1982). No entanto,

Di Rosa *et al.* (1971) demonstraram que a depleção da histamina com o composto 48/80 inibe a fase inicial do edema de pata induzido pela carragenina. Esses resultados indicam que, embora ocorra liberação da histamina durante o processo inflamatório, a sua contribuição para o edema induzido pela carragenina não depende da interação com receptores H<sub>1</sub>. Al-Haboubi & Zeitlin (1983) demonstraram que a mepiramina, um antagonista H<sub>1</sub>, usada em uma dose quatro vezes maior do que aquela usada por Di Rosa *et al.* (1971), também não inibe o edema induzido pela carragenina. Por outro lado, a cimetidina, um antagonista H<sub>2</sub>, inibe parcialmente a resposta inflamatória induzida por esse mesmo estímulo inflamatório (AL-HABOUBI & ZEITLIN, 1983). O papel dos receptores H<sub>2</sub> foi posteriormente confirmado por Ezeamuzie & Umezurike (1989), que demonstraram o efeito inibitório da cimetidina, ranitidina e loxatidina sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

O edema induzido pelo PDD parece envolver a liberação e formação de vários mediadores como a histamina, a 5-HT e o NO. Provavelmente, ocorre a liberação desses mediadores na fase inicial da resposta. A inibição parcial induzida pelos antagonistas dos receptores para a histamina e a 5-HT e pelo inibidor da síntese do NO sugere, também, que esses mediadores atuam de forma conjunta, não existindo o efeito predominante de um deles. Essa hipótese é sustentada pela observação de um amplo e prolongado efeito inibitório do edema quando a liberação de todos os mediadores inflamatórios mencionados é inibida pela dexametasona. Esse amplo mecanismo de ação resulta em inibição extensa do edema em todo curso temporal, provavelmente porque inibe a liberação inicial dos mediadores e, conseqüentemente, o estabelecimento dessa resposta. É possível, também, que o prolongado efeito inibitório sobre o edema de pata seja resultado da inibição da síntese de mediadores inflamatórios ao longo de todo o curso temporal, uma vez que a dexametasona apresenta tempo de meia-vida de eliminação bastante longo.

Por outro lado, a alodínia mecânica induzida pelo PDD foi parcialmente inibida apenas pelos inibidores da COX e NOS. Essa resposta difere daquela observada para a carragenina, que além de envolver o NO e a 5-HT, é abolida pelos inibidores da COX. Considerando essas observações, propõe-se que a injeção i.pl. do PDD induz a liberação local de mediadores inflamatórios que contribuem para a indução

ou facilitação da resposta nociceptiva. No entanto, a alodínia também pode ser consequência dos efeitos diretos da PKC nos nociceptores. Vários estudos demonstraram que a ativação da PKC *in vitro* excita os nociceptores. Os ésteres de forbol excitam e sensibilizam os nociceptores da pata de gatos (SCHEPELMANN *et al.*, 1993) e do testículo de cães (LENG *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que esses ativadores da PKC aumentam o efeito da bradicinina sobre os nociceptores do testículo de cães (MIZUMURA *et al.*, 1997). Esses resultados demonstram que a ativação da PKC pelos ésteres de forbol excita e sensibiliza diretamente os nociceptores, o que pode justificar a alodínia mecânica induzida pelo PDD.

Também foi investigado o efeito da morfina sobre a resposta nociceptiva induzida pelo PDD ou pela carragenina. Esse analgésico opióide inibiu parcialmente a alodínia mecânica induzida pela carragenina, mas não pelo PDD. Vários estudos demonstraram que a morfina inibe a resposta nociceptiva induzida pela carragenina (HARGREAVES *et al.*, 1988; JORIS *et al.*, 1990; TONUSSI & FERREIRA, 1992). Geralmente, o efeito antinociceptivo induzido pela morfina é de curta duração. Além de inibir a sensibilização induzida pela carragenina, a morfina também diminui a expressão do *c-fos* na medula espinhal (HONORÉ *et al.*, 1996). A ausência de efeito inibitório da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD é um resultado de difícil interpretação. É pouco provável que essa ausência seja resultado do uso de doses inadequadas desse analgésico opióide, pois as mesmas doses inibiram a resposta nociceptiva induzida pela carragenina em ratos e pelo calor, no modelo da placa quente, em camundongos. Alguns estudos demonstraram que os ésteres de forbol aumentam a rápida dessensibilização dos receptores opióides induzida pela morfina (BAILEY *et al.*, 2004; KING *et al.*, 1999; NARITA *et al.*, 1997), uma observação que poderia dar suporte ao resultado observado no presente estudo. Entretanto, é pouco provável que essa seja a razão, uma vez que o PDD foi injetado por via i.pl., induzindo sensibilização restrita ao local da injeção (SOUZA *et al.*, 2002), enquanto a morfina foi administrada por via i.p., o que permite um efeito sistêmico. O efeito diferencial da morfina sobre a alodínia mecânica induzida pelo PDD ou pela carragenina, mais uma vez, indica que os ésteres de forbol induzem resposta nociceptiva cujo processamento ocorre de forma bastante diferente daquele associado à resposta induzida pela carragenina.

Uma vez que apenas os inibidores da COX e NOS, administrados por via i.p., inibiram a resposta nociceptiva induzida pelo PDD, investigou-se o efeito da injeção local da indometacina ou do L-NAME sobre essa resposta. Nesse protocolo, foi usada uma dose reduzida desses inibidores com o objetivo de investigar o seu possível efeito local. A injeção local da indometacina ou do L-NAME não inibiu a alodínia mecânica induzida por PDD, o que sugere o envolvimento dos eicosanóides e do NO em sítios distintos daquele onde foi feita a injeção do ativador da PKC. Suporte a essa hipótese é encontrado em vários estudos que demonstraram o papel do NO e dos eicosanóides em estruturas espinhais (DIRIG & YAKSH, 1999; FRESHWATER *et al.*, 2002; LUI & LEE, 2004; MILNE *et al.*, 2001; OSBORNE & CODERRE, 1999; PARK *et al.*, 2000; RIVOT *et al.*, 2002a, b) e supraespinhais (GELGOR *et al.*, 1992; SALTER *et al.*, 1996) no processamento da resposta nociceptiva induzida por estímulos periféricos. A medula espinhal e o cérebro representariam, assim, sítios de ação para diferentes drogas com atividade antinociceptiva. Os resultados do presente estudo, permitem sugerir que a ativação periférica da PKC ativa diretamente nociceptores, o que aumenta a liberação dos eicosanóides e do NO em estruturas espinhais e/ou supraespinhais, contribuindo, assim, para a sensibilização induzida pelo PDD.

A análise conjunta dos resultados do presente estudo indica que o PDD representa um estímulo inflamatório muito distinto da carragenina. Os resultados obtidos no presente estudo, bem como aqueles publicados, são sugestivos de que a carragenina representa um estímulo inflamatório inespecífico que induz a produção local de vários mediadores inflamatórios. Embora o PDD também possa estimular a produção local de vários mediadores inflamatórios, os resultados indicam que a resposta nociceptiva provavelmente resulta da ativação direta dos nociceptores. Os resultados obtidos são importantes quando se leva em consideração que eles representam uma ampla caracterização da resposta nociceptiva e do edema induzidos por um ativador da PKC, bem como de alguns mediadores que estão envolvidos na indução dessas respostas.

No campo das perspectivas estabelecidas a partir desse estudo, propõe-se o uso do PDD como uma ferramenta farmacológica importante para investigar drogas potencialmente úteis no tratamento de condições dolorosas, uma vez que o

processamento da resposta nociceptiva induzida pelo PDD apresenta diferenças evidentes em relação àquele associado à resposta induzida por alguns estímulos inflamatórios inespecíficos como a carragenina. É possível que a investigação do efeito de drogas sobre a resposta nociceptiva induzida pelos ativadores da PKC permita melhor compreensão sobre os mecanismos associados ao seu efeito antinociceptivo, tanto em relação aos mediadores envolvidos quanto ao local de ação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELIZZI, R.A. COX-1 and COX-2 in health and disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, Chattanooga, v. 99, Sp. 11, S. 7-12, nov. 1999.

AL-HABOUBI, H.A. & ZEITLIN, I.J. The actions of cimetidine hydrochloride and mepyramine maleate in rat adjuvant arthritis. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 175-185, feb. 1982.

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

ALMEIDA, A.P.; BAYER, B.M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 214, n. 1, p. 74-79, jul. 1980.

ALVES, R.V.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. *Peptides*, Fayetteville, v. 20, n. 8, p. 921-927, 1999.

AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; DONNERER, J. Histamine-induced edema in the rat paw – effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 279, n. 2-3, p. 227-231, jun. 1995.

AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; PESKAR, B.A. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 306, n. 1-3, p. 89-91, jun. 1996.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv. Pharmacol.*, New York, v. 35, p. 27-78, 1996.

ARMSTRONG, R.A.; MARR, C.; JONES, R.L. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. *Prostaglandins*, New York, v. 49, n. 4, p. 205-224, apr. 1995.

ARVIER, P.T.; CHAHL, L.A.; LADD, R.J. Modification by capsaicin and compound 48/80 of dye leakage induced by irritants in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 59, n. 1, p. 61-68, jan. 1977.

BAILEY, C.P.; KELLY, E.; HENDERSON, G. Protein kinase C activation enhances morphine-induced rapid desensitization of  $\mu$ -opioid receptors in mature rat locus coeruleus neurons. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 66, n. 6, p.1592-1598, dec. 2004.

BARNETT, A.; IORIO, L.C.; KREUTNER, W.; TOZZI, S.; AHN, H.S.; GULBENKIAN, A. Evaluation of the CNS properties of SCH 29851, a potential

non-sedating antihistamine. *Agents Actions*, Basel, v. 14, n. 5-6, p. 590-597, jun. 1984.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M.C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v. 180, n. 1, p. 5-15, apr. 2001.

BAUMGARTNER, R.A.; DERAMO, V.A.; BEAVEN, M.A. Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 157, n. 9, p. 4087-4093, nov. 1996.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 924, n. 2, p. 219-228, jan. 2002.

BHAVE, G.; HU, H.; GLAUNER, K.S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D.J.; OXFORD, G.S.; GEREAU, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 100, n. 21, p. 12480-12485, oct. 2003.

BILEVICIUTE, I.; STENFORS, C.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 125, n. 6, p. 1304-1312, nov. 1998.

BRESSAN, E.; FARGES, R.C.; FERRARA, P.; TONUSSI, C.R. Comparison of two PBR ligands with classical antiinflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. *Life Sci.*, Oxford, v. 72, n. 23, p. 2591-2601, apr. 2003.

BROWN, N.J. & ROBERTS II, J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: *GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap. 25, p. 485-501.

BUCKLEY, T.L.; BRAIN, S.D.; COLLINS, P.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 146, n. 10, p. 3424-3430, may. 1991.

CAIRNS, B.E.; GAMBAROTA, G.; SVENSSON, P.; ARENDT-NIELSEN, L.; BERDE, C.B. Glutamate-induced sensitization of rat masseter muscle fibers. *Neuroscience*, Oxford, v. 109, n. 2, p. 389-399, 2002.

CALOCA, M.J.; WANG, H.; KAZANIETZ, M.G. Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of  $\beta$ 2-chimaerin, a "non-protein kinase C" phorbol ester receptor. *Biochem. J.*, London, v. 375, Pt. 2, p. 313-321, oct. 2003.

CAMPOS, R.O.P.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist.

*Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 360, n. 3, p. 278-286, sep. 1999.

CANTWELL, M.E. & FOREMAN, J.C. Characteristics of the effect of phorbol ester on rat mast cells: interaction with anti-IgE. *Agents Actions*, Basel, v. 18, n. 1-2, p. 77-80, apr. 1986.

CATERINA, M.J.; ROSEN, T.A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A.J.; JULIUS, D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, London, v. 398, n. 6726, p. 436-441, oct. 1999.

**CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, London, v. 389, n. 6653, p. 816-824, oct. 1997.**

**CATERINA, M.J. & JULIUS, D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.*, Palo Alto, v. 24, p. 487-517, 2001.**

CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; McNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC- $\epsilon$  in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 617-624, jul. 1999.

CHAKRAVARTY, N. The role of protein kinase C in histamine secretion from mast cells. *Acta Physiol. Scand.*, Stockholm, v. 139, n. 2, p. 319-331, jun. 1990.

CHANG, Q.; SOPER, B.D.; YACYSHYN, B.R.; TEPPERMAN, B.L. Alterations in protein kinase C isoforms in experimentally-induced colitis in the rat. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 49, n. 1, p. 27-35, jan. 2000.

CHEN, X. & LEVINE, J.D. NOS inhibitor antagonism of PGE<sub>2</sub>-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. *J. Neurophysiol.*, Washington, v. 81, n. 3, p. 963-966, mar. 1999.

CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J.D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptor by prostaglandin E<sub>2</sub> in the rat. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 267, n. 2, p. 105-108, may. 1999.

CHILLINGWORTH, N.L. & DONALDSON, L.F. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J. Neurosci. Methods*, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 45-52, sep. 2003.

CHO, H.; SHIN, J.; SHIN, C.Y.; LEE, S.; OH, U. Mechanosensitive ion channel in cultured sensory neurons of neonatal rat. *J. Neurosci.*, Baltimore, v. 22, n. 4, p. 1238-1247, feb. 2002.

CHU, D.Q.; CHOY, M.; FOSTER, P.; CAO, T.; BRAIN, S.D. A comparative study of the ability of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin (13 - 52) to modulate microvascular but not thermal hyperalgesia responses. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 130, n. 7, p. 1589-1596, aug. 2000.



CLAPHAM, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, London, v. 426, n. 6966, p. 517-524, dec. 2003.

CODERRE, T.J. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 181-184, jun. 1992.

COLE, H.W.; BROWN, C.E.; MAGEE, D.E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R.E.; BRYANT, H.U. Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. *Gen. Pharmacol.*, Oxford, v. 26, n. 2, p. 431-436, mar. 1995.

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

COREY, D.P. New TRP channel in hearing and mechanosensation. *Neuron*, Cambridge, v. 39, n. 4, p. 585-588, aug. 2003.

CORSINI, E.; BATTAINI, F.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; RACCHI, M.; GOVONI, S.; GALLI, C.L. A defective protein kinase C anchoring system underlying age-associated impairment in TNF- $\alpha$  production in rat macrophages. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 163, n. 6, p. 3468-3473, sep. 1999.

CRANDALL, M.; KWASH, J.; YU, W.; WHITE, G. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain*, Amsterdam, v. 98, n. 1-2, p. 109-117, jul. 2002.

DAMAS, J. & LIÉGEOIS, J. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 359, n. 3, p. 220-227, mar. 1999.

DAMAS, J. & REMACLE-VOLON, G. Mast cell amines and the oedema induced by zymosan and carrageenan in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 121, n. 3, p. 367-376, mar. 1986.

DAVIS, A.J. & PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 113, n. 1, p. 63-68, sep. 1994.

DELESCLUSE, C.; VAIGOT, P.; BAILLY, J.; HENSBY, C.N. Effects of antiinflammatory agents on edema and DNA synthesis induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the guinea pig. *Agents Actions*, Basel, v. 21, n. 3-4, p. 290-292, aug. 1987.

de LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; de TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNE, J.M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. *Curr. Med. Chem.*, Schiphol, v. 7, n. 10, p. 1041-1062, oct. 2000.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLORON, 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*, Basel, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, mar. 1989.

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.

DIRIG, D.M. & YAKSH, T.L. Spinal synthesis and release of prostanoids after peripheral injury and inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 469, p. 401-408, 1999.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.*, London, v. 104, n. 1, p. 15-29, may. 1971.

DONG, Y.J.; JONES, R.L.; WILSON, N.H. Prostaglandin E receptor subtypes in smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 87, n. 1, p. 97-107, jan. 1986.

DOUGLASS, J.; DHAMI, D.; BULPITT, M.; LINDLEY, I.J.; SHUTE, J.; CHURCH, M.K.; HOLGATE, S.T. Intradermal challenge with interleukin-8 causes tissue oedema and neutrophil accumulation in atopic and non-atopic human subjects. *Clin. Exp. Allergy*, Oxford, v. 26, n. 12, p. 1371-1379, dec. 1996.

DOURSOUT, M.F.; LIANG, Y.; CHELLY, J.E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. *Can. J. Anaesth.*, Toronto, v. 50, n. 9, p. 909-916, nov. 2003.

DUARTE, I.D.; FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 221, n. 1, p. 171-174, oct. 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.

EBERHARDT, W.; PLUSS, C.; HUMMEL, R.; PFEILSCHIFTER, J. Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1beta and cAMP in rat mesangial cells. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 160, n. 10, p. 4961-4969, may. 1998.

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.

ESCHALIER, A.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Influence of a specific 5-HT<sub>3</sub> antagonist on carrageenan-induced hyperalgesia in rats. *Pain*, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 249-255, feb. 1989.

EZEAMUZIE, C.I. & UMEZURIKE, C.C. Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists on acute inflammatory of the rat paw oedema. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 41, n. 4, p. 261-265, apr. 1989.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; de ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effect of prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins*, New York, v. 16, n. 1, p. 31-37, jul. 1978.

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.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 39-48, dec. 1978.

FLYNN, S.B. & OWEN, D.A. Histamine H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>- receptor antagonists reduce histamine-induced increases in vascular permeability and oedema formation in cat skeletal muscle. *Agents Actions*, Basel, v. 9, n. 5-6, p. 450-454, dec. 1979.

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.

FRAYER, S.M.; BARBER, L.A.; VASKO, M.R. Activation of protein kinase C enhances peptide release from rat spinal cord slices. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 265, n. 1, p. 17-20, apr. 1999.

FRESHWATER, J.D.; SVENSSON, C.I.; MALMBERG, A.B.; CALCUTT, N.A. Elevated spinal cyclooxygenase and prostaglandin release during hyperalgesia in diabetic rats. *Diabetes*, New York, v. 51, n. 7, p. 2249-2255, jul. 2002.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMITSU, T.; TADESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 657, n. 1-2, p. 133-140, sep. 1994.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide *In Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nervous and Endothelium.* ed. By P.M. Vanhoutte, pp. 401-414, Raven Press, New York, 1988. Apud FURCHGOTT, R.F. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA*, Chicago, v. 276, n. 14, oct. 1996.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, London, v. 288, n. 5789, p. 373-376, nov. 1980.

GELLER, D.A.; de VERA, M.E.; RUSSELL, D.A.; SHAPIRO, R.A.; NUSSLER, A.K.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T.R. A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 155, n. 10, p. 4890-4898, nov. 1995.

GEIGER, M.; WRULICH, O.A.; JENNY, M.; SCHWAIGER, W.; GRUNICKE, H.H.; ÜBERALL, F. Defining the human targets of phorbol ester and diacylglycerol. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, London, v. 5, n. 6, p. 631-641, dec. 2003.

GELGOR, L.; CARTMELL, S.; MITCHELL, D. Intracerebroventricular micro-injections of non-steroidal anti-inflammatory drugs abolish reperfusion hyperalgesia in the rat's tail. *Pain*, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 323-329, sep. 1992.

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

GROSMAN, N. & NIELSEN, K.A. The influence of tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) on histamine release from isolated rat mast cells. *Agents Actions*, Basel, v. 24, n. 1-2, p. 40-47, jun. 1988.

HAMILTON, S.G.; WADE, A.; McMAHON, S.B. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 126, n. 1, p. 326-332, jan. 1999.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 77-88, jan. 1988.

HAY, C.H. & de BELLEROCHE, J.S. Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar FCA in parallel with inhibition of oedema. *Neuropharmacology*, Oxford, v. 37, n. 6, p. 739-744, jun. 1998.

HEIMAN, A.S. & CREWS, F.T. Hydrocortisone inhibits phorbol ester stimulated release of histamine and arachidonic acid from mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 130, n. 2, p. 640-645, jul. 1985.

HIGGS, G.A.; EAKINS, K.E.; MUGRIDGE, K.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 81-6, aug.1980.

HINZ, B. & BRUNE, K. Cyclooxygenase-2- 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 300, n. 2, p. 367-375, feb. 2002.

HOFMANN, J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.*, Bethesda, v. 11, n. 8, p. 649-669, jul. 1997.

HONG, Y. & ABBOTT, F.V. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience*, Oxford, v. 63, n. 3, p. 827-836, dec. 1994.

HONORÉ, P.; BURITOVA, J.; BESSON, J.M. The effects of morphine on carrageenin-induced spinal c-Fos expression are completely blocked by beta-funaltrexamine, a selective mu-opioid receptor antagonist. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 732, n. 1-2, p. 242-246, sep. 1996.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v. 46, n. 2, p. 157-203, jun. 1994.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 71, n. 4, p. 533-554, apr. 2002.

HRUBEY, P.S.; HARVEY, A.K.; BENDELE, A.M.; CHANDRASEKHAR, S. Effects of anti-arthritic drugs on IL-1 induced inflammation in rats. *Agents Actions*, Basel, v. 34, n. 1-2, p. 56-59, sep. 1991.

HUA, X.; CHEN, P.; YAKSH, T.L. Inhibition of protein kinase C reduces nerve injury-induced tactile allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 276, n. 2, p. 99-102, dec. 1999.

HUDA, R.; VERGARA, L.A.; SOLANKI, D.R.; SHERWOOD, E.R.; MATHRU, M. Selective activation of protein kinase C delta in human neutrophils following ischemia reperfusion of skeletal muscle. *Shock*, Augusta, v. 21, n. 6, p. 500-504, jun. 2004.

HUGUET, A.; RECIO, M.C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R.; RÍOS, J. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 410, n. 1, p. 69-81, dec. 2000.

HUNT, S.P. & MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.*, London, v. 2, n. 2, p. 83-91, feb. 2001.

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.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 211, n. 2, p. 177-182, feb. 1992.

IBUKI, T.; MATSUMURA, K.; YAMAZAKI, Y.; NOZAKI, T.; TANAKA, Y.; KOBAYASHI, S. Cyclooxygenase-2 is induced in the endothelial cells throughout the central nervous system during carrageenan-induced hind paw inflammation;

its possible role in hyperalgesia. *J. Neurochem.*, Oxford, v. 86, n. 2, p. 318-328, jul. 2003.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals. *In* Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nervous and Endothelium. ed. By P.M. Vanhoutte, pp. 427-436, Raven Press, New York, 1988. Apud FURCHGOTT, R.F. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA*, Chicago, v. 276, n. 14, oct. 1996.

IGNJATOVIC, T.; STANISAVLJEVIC, S.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A.; ERDOS, E.G. Kinin B<sub>1</sub> receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 66, n. 5, p. 1310-1316, aug. 2004.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Involvement of tachykinin receptors in oedema formation and plasma extravasation induced by substance P, neurokinin A, and neurokinin B in mouse ear. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 45, n. 7, p. 326-323, jul. 1996.

INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBUTA, S.; YOSHIYA, I. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 1-7, dec. 1997.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN – IASP PAIN TERMINOLOGY. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Acessado em nov. 2004.

JACOBSON, P.B.; KUCHERA, S.L.; METZ, A.; SCHÄCHTELE, C.; IMRE, K.; SCHRIER, D.J. Anti-inflammatory properties of Gö 6850: A selective inhibitor of protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 275, n. 2, p. 995-1002, nov. 1995.

JORIS, J.; COSTELLO, A.; DUBNER, R.; HARGREAVES, K.M. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. *Pain*, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 95-103, oct. 1990.

JUAN, H. Dependence of histamine-evoked nociception on prostaglandin release. *Agents Actions*, Basel, v. 11, n. 6-7, p. 706-710, dec. 1981.

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

KACZMAREK, L.K. The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release. *Trends Neurosci.*, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 30-34, jan. 1987.

KAM, P.C. & SEE, A.U. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and

pharmacological role. *Anaesthesia*, London, v. 55, n. 5, p. 442-449, may. 2000.

KANAAN, S.A.; SAADÉ, N.E.; HADDAD, J.J.; ABDELNOOR, A.M.; ATWEH, S.F.; JABBUR, S.J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain. *Pain*, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 373-379, aug. 1996.

KANASHIRO, C.A. & KHALIL R.A. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, Oxford, v. 25, n. 12, p. 974-985, dec. 1998.

KAYSER, V. & GUILBAUD, G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. *Pain*, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 99-107, jan. 1987.

KAZANIETZ, M.G. Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 61, n. 4, p. 759-767, apr. 2002.

KEHL, L.J.; TREMPPE, T.M.; HARGREAVES, K.M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. *Pain*, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 333-343, apr. 2000.

KEITH, R.A. & SALAMA, A.I. Individual variations of prostanoid agonist responses in rabbit aorta: evidence for the independent regulation of prostanoid receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 92, n. 1, p. 133-148, sep. 1987.

KENNEDY, I.; COLEMAN, R.A.; HUMPHREY, P.P.; LEVY, G.P.; LUMLEY, P. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins*, New York, v. 24, n. 5, p. 667-689, nov. 1982.

KING, A.P.; HALL, K.E.; MacDONALD, R.L. kappa- and mu-opioid inhibition of N-type calcium currents is attenuated by 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate and protein kinase C in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 289, n. 1, p. 312-320, apr. 1999.

KIRSCHSTEIN, T.; GREFFRATH, W.; BÜSSELBERG, D.; TREEDE, R. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J. Neurophysiol.*, Washington, v. 28, n. 6, p. 2853-2860, dec. 1999.

KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; McMAHOM, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; McCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, J.D.; MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C  $\epsilon$  mutant mice. *Neuron*, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 253-260, sep. 1999.

KOBAYASHI, T. & NARUMIYA, S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other. Lipid Mediat.*, New York, v. 68-69, p. 557-573, aug. 2002.

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

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 266, n. 20, p. 12866-12872, jul. 1991.

LAM, F.F. & YIP, A.L. Unique gradual and sustained vasodilator response to substance P in the rabbit knee joint. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 400, n. 2-3, p. 327-335, jul. 2000.

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

LEE, S.W.; TSOU, A.P.; CHAN, H.; THOMAS, J.; PETRIE, K.; EUGUI, E.M.; ALLISON, A.C. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, n. 4, p. 1204-1208, feb.1988.

LENG, S.; MIZUMURA, K.; KODA, H.; KUMAZAWA, T. 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.

LEVINE, L. Prostacyclin production after treatment of rat liver cells with tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate is mediated by a phorbol-ester-stimulated intermediate. *Cell. Signal.*, Oxford, v. 8, n. 8, p. 561-565, dec. 1996.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.*, Oxford, v. 8, n. 11, p. 601-606, jun. 1969.

LEWIN, R.G.; LU, Y.; PARK, T.J. A plethora of painful molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.*, London, v. 14, n. 4, p. 443-449, aug. 2004.

LI, H; OEHRLEIN, S.A.; WALLERATH, T.; IHRIG-BIEDERT, I.; WOHLFART, P.; ULSHOFER, T.; JESSEN, T.; HERGET, T.; FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol. Pharmacol.*, New York, v. 53, n. 4, p. 630-637, apr. 1998.

LIN, W.W. & CHEN, B.C. Induction of cyclo-oxygenase-2 expression by methyl arachidonyl fluorophosphonate in murine J774 macrophages: roles of protein kinase C, ERKs and p38 MAPK. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 126, n. 6, p. 1419-1425, mar. 1999.



LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 221, n. 1, p. 261-267, apr. 1982.

LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 375-381, aug. 1985.

Lo VERME, J.L.; FU, J.; ASTARITA, G.; RANA, G.L.; RUSSO, R.; CALIGNANO, A.; PIOMELLI, D. The nuclear receptor PPAR- $\alpha$  mediates the antiinflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.*, New York, oct. 2004. *In press.*

LUI, P.W. & LEE, C.H. Preemptive effects of intrathecal cyclooxygenase inhibitor or nitric oxide synthase inhibitor on thermal hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Life Sci.*, Oxford, v. 75, n. 21, p. 2527-2538, oct. 2004.

MARSHALL, L.A. Arachidonic acid metabolism of cultured peritoneal rat macrophages and its manipulation by nonsteroidal antiinflammatory agents. *Immunopharmacology*, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 177-187, may - jul. 1988.

McKEMY, D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, London, v. 416, n. 6876, p. 52-58, mar. 2002.

MEDEIROS, M.V.; BINHARA, I.M.; MORENO Jr., H.; ZATZ, R.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 285, n. 2, p. 109-114, oct. 1995.

MELLOR, H. & PARKER, P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.*, London, v. 332, Pt. 2, p. 281-292, jun. 1998.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, Oxford, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MILLER, B.W.; BAIER, L.D.; MORRISON, A.R. Overexpression of protein kinase C- $\zeta$  isoform increases cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.*, Washington, v. 273, Pt. 1, C. 130-136, jul. 1997.

MILLER, R.J. Protein kinase C: a key regulator of neuronal excitability? *Trends Neurosci.*, Amsterdam, v. 9, p. 538-541, nov-dec. 1986.

MILNE, B.; HALL, S.R.; SULLIVAN, M.E.; LOOMIS, C. The release of spinal prostaglandin E<sub>2</sub> and the effect of nitric oxide synthetase inhibition during strychnine-induced allodynia. *Anesth. Analg.*, Cleveland, v. 93, n. 3, p.728-733, sep. 2001.

MIZUMURA, K.; KODA, H.; KUMAZAWA, T. Evidence that protein kinase C activation is involved in the excitatory and facilitatory effects of bradykinin on

canine visceral nociceptors in vitro. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 237, p. 29-32, nov. 1997.

MOBARAKEH, J.I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMA, S.; KUTSUWA, M.; KURAMASU, A.; LIN, Z.Y.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, Y.; YANAI, K. Role of histamine H<sub>1</sub> receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 81-9, mar. 2000.

MOCHLY-ROSEN, D. & KAUVAR, L.M. Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.*, New York, v. 44, p. 91-145, 1998.

MOMOSE, I.; TERASHIMA, M.; NAKASHIMA, Y.; SAKAMOTO, M.; ISHINO, H.; NABIKA, T.; HOSOKAWA, Y.; TANIGAWA, Y. Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon- $\gamma$ -treated RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1498, n. 1, p. 19-31, oct. 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, jun. 1991.

NAGY, I. & RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, Oxford, v. 88, n. 4, p. 995-997, 1999.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 128, n. 4, p. 859-859, oct. 1999.

NARITA, M.; OHSAWA, M.; MIZOGUCHI, H.; KAMEI, J.; TSENG, L.F. Pretreatment with protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate attenuates the antinociception induced by mu- but not epsilon-opioid receptor agonist in the mouse. *Neuroscience*, Oxford, v. 76, n. 1, p. 291-298, jan. 1997.

NARITA, M.; IMAI, S.; OE, K.; NARITA, M.; KUBOTA, C.; YAJIMA, Y.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Induction of c-fos expression in the mouse brain associated with hyperalgesia induced by intrathecal injection of protein kinase C activator. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 1015, n. 1-2, p. 189-193, jul. 2004.

NEWTON, A.C. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 161-167, apr. 1997.

NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, Washington, v. 233, n. 4761, p. 305-312, jul. 1986.

OH, C.D.; KANG, S.S.; HA, M.J.; CHNG, J.S. Analysis of protein kinase C isoforms involved in the activation of laminin receptor in Raw264.7 macrophages. *IUBMB Life.*, London, v. 48, n. 4, p. 439-443, oct. 1999.

OHUCHI, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, C.; HAYASHI, Y.; HIRASAWA, N.; TSURUFUJI, S.; FUJIKI, H.; SUGIMURA, T. Analysis of tumor-promoter-induced inflammation in rats: participation of histamine and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 925, n. 2, p. 156-163, aug. 1987.

OSBORNE, M.G. & CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.126, n.8, p.1840-1846, apr. 1999.

PAALZOW, G.H. & PAALZOW, L.K. Promethazine both facilitates and inhibits nociception in rats: effect of the testing procedure. *Psychopharmacology (Berl)*, Berlin, v.85, n.1, p.31-36, 1985.

PALECEK, J.; PALECKOVA, V.; WILLIS, W.D. The effect of phorbol ester on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. *Pain*, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 597-605, apr. 1999.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, Oxford, v. 102, n. 4, p. 937-944, 2001.

PARK, Y.H.; SHIN, C.Y.; LEE, T.S.; HUH, I.H.; SOHN, U.D. The role of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 52, n. 4, p. 431-436, apr. 2000.

PASQUALE, C.P.; MARTINS, M.A.; BOZZA, P.T.; SILVA, P.M.; FARIA NETO, H.C.; PIRES, A.L.; CORDEIRO, R.S. Bradykinin induces eosinophil accumulation in rat pleural cavity. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, Basel, v. 95, n. 2-3, p. 244-247, 1991.

PAUL, A.; PENDREIGH, R.H.; PLEVIN, R. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 114, n. 2, p. 482-488, jan. 1995.

PEIER, A.M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A.C.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; STORY, G.M.; EARLEY, T.J.; DRAGONI, I.; McINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, Cambridge, v. 108, n. 5, p. 705-715, mar. 2002.

PERKINS, M.N.; KELLY, D.; DAVIS, A.J. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v. 73, n. 7, p. 832-836, jul. 1995.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPESTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA Jr, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.M.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 97, n. 14, p. 8140-8145, jul. 2000.

PINHEIRO, R.M. & CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 51, n. 12, p. 603-610, dec. 2002.

POOLE, A.W.; PULA, G.; HERS, I.; GROSBY, D.; JONES, M.L. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v. 25, n. 10, p. 528-535, oct. 2004.

PRADO, W.A.; SCHIAVON, V.F.; CUNHA, F.Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, apr. 2002.

PREMKUMAR, L.S. & AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, London, v. 408, n. 6815, p. 985-990, dec. 2000.

PRICE, M.P.; LEWIN, G.R.; McILRATH, S.L.; CHENG, C.; XIE, J.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; MANNSFELDT, A.G.; BRENNAN, T.J.; DRUMMOND, H.A.; QIAO, J.; BENSON, C.J.; TARR, D.E.; HRSTKA, R.F.; YANG, B.; WILLIAMSON, R.A.; WELSH, M.J. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*, London, v. 407, n. 6807, p. 1007-1011, oct. 2000.

PROUD, D. & KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.*, Palo Alto, v. 6, p. 49-83, 1988.

PUIGNERÓ, V. & QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. *Inflammation*, New York, v. 21, n. 4, p. 431-442, aug. 1997.

QU, X.F.; HAYASHI, M.; YAMAKI, K.; OH-ISHI, S. Assessment of vascular permeability increase in the mouse by dye leakage during paw edema. *Jpn. J. Pharmacol.*, Kyoto, v. 52, n. 3, p. 500-503, mar. 1990.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of Pain*, ed. WALL, P.D.; MELZACK, R., p. 11-57. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

RAMIREZ, M.M.; KIM, D.D.; DURAN, W.N. Protein kinase C modulates microvascular permeability through nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol.*, Washington, v. 271, n. 4 Pt2, p. 1702-1705, 1996.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.12, p.164-188.

RICKINGER, O.; SHERIFF, H.; HIRSCHMANN, R. Effects of (D-Ala<sup>2</sup>) methionine enkephalinamide in PMA-induced mouse ear edema. *Agents Actions*, Basel, v. 41, n. 1-2, p. 118-119, mar. 1994.

RIVOT, J.P.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.M. Subcutaneous formalin and intraplantar carrageenan increase nitric oxide release as measured by in vivo voltammetry in the spinal cord. *Eur. J. Pain*, London, v. 6, n. 1, p. 25-34, 2002a.

RIVOT, J.P.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.M. Increased nitric oxide release by transient peripheral noxious inputs to the spinal cord of rats: an in vivo voltammetric approach. *Neurosci. Lett.*, Amsterdam, v. 320, n. 1-2, p. 86-90, mar. 2002b.

ROCHA, J.C.S.; PEIXOTO, M.E.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 136, n. 4, p. 588-596, jun. 2002.

ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, Washington, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROTE, N.S. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. 3<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 1998. cap. 7, p. 205-236.

RUMORE, M.M. & SCHLICHTING, D.A. Analgesic effects of antihistaminics. *Life Sci.*, Oxford, v. 36, n. 5, p. 403-416, feb.1985.

RYAN, G.B. & MAJNO, G. Acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v. 86, n. 1, p. 184-271, jan. 1977.

SAGI-EISENBERG, R.; FOREMAN, J.C.; SHELLY, R. Histamine release induced by histone and phorbol ester from rat peritoneal mast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 11-17, jul. 1985.

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.

SALTER, M.; STRIJBOS, P.J.; NEALE, S.; DUFFY, C.; FOLLENFANT, R.L.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neuroscience*, Oxford, v. 73, n. 3, p. 649-655, aug. 1996.

SAMAD, T.A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol. Med.*, Oxford, v. 8, n. 8, p. 390-396, aug. 2002.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. PKC zeta participates in activation of inflammatory response induced by enteropathogenic *E. coli*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, Bethesda, v. 285, n. 3, p. C512-521, sep. 2003.

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.

SCHOLZ, J. & WOOLF, C.J. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.*, New York, v. 5, Sp. 1062-7, nov. 2002.

SHAPIRA, L.; SYLVIA, V.L.; HALABI, A.; SOSKOLNE, W.A.; VAN DYKE, T.E.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z. Bacterial lipopolysaccharide induces early and late activation of protein kinase C in inflammatory macrophages by selective activation of PKC- $\epsilon$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 240, n. 3, p. 629-634, nov. 1997.

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

SHIGEMATSU, S.; ISHIDA, S.; GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. *Am. J. Physiol.*, Washington, v. 277, Pt. 2, H. 152-160, jul. 1999.

SHIN, S.S.; BYUN, Y.; LIM, K.M.; CHOI, J.K.; MOH, J.H.; KIM, J.K.; JEONG, Y.S.; KIM, J.Y.; CHOI, Y.H.; KOH, H.J.; PARK, Y.H.; OH, Y.I.; NOH, M.S.; CHUNG, S. In vitro structure-activity relationship and in vivo studies for a novel class of cyclooxygenase-2 inhibitors: 5-aryl-2,2-dialkyl-4-phenyl-3(2H)furanone derivatives. *J. Med. Chem.*, Easton, v. 47, n. 4, p. 792-804, feb. 2004.

SLADDECZEK, F. Putative role of inositol phospholipid metabolism in neurons. *Biochimie*, Paris, v. 69, n. 4, p. 287-296, apr. 1987.

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 95, n. 22, p. 13313-13318, oct. 1998.

SNIDER, W.D. & McMAHON, S.B. Tackling pain in source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 629-632, apr. 1998.

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.

STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T.R.; CURRAN, R.D.; McINTYRE, L.A.; GEORGESCU, H.I.; SIMMONS, R.L.; EVANS, C.H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 147, n. 11, p. 3915-3920, dec. 1991.

ST-DENIS, A.; CHANO, F.; TREMBLAY, P.; ST-PIERRE, Y.; DESCOTEAUX, A. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophages cell line. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 273, n. 49, p. 32787-32792, dec. 1998.

STOCHLA, K. & MASLINSKI, S. Carrageenan-induced oedema in the rat paw - histamine participation. *Agents Actions*, Basel, v. 12, n. 1-2, p. 201-202, apr. 1982.

SUFKA, K.J.; SCHOMBURG, F.M.; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Phoenix, v. 41, n. 1, p. 53-56, jan. 1992.

TAIWO, Y.O. & LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*, Oxford, v. 48, n. 2, p. 485-490, 1992.

TAKAI, Y.; KISHIMOTO, A.; KIKKAWA, U.; MORI, T.; NISHIZUKA, Y. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 91, n. 4, p. 1218-1224, dec. 1979.

TAKEI, M. & ENDO, K. Effect of a potent selective protein kinase C inhibitor on histamine release from mast cells. *J. Pharm. Sci.*, Easton, v. 82, n. 2, p. 209-210, feb. 1993.

TAO, F.; TAO, Y.X.; ZHAO, P.; LI, D.; LIAW, W.J.; RAJA, S.N.; JOHNS, R.A. Intact carrageenan-induced hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience*, Oxford, v. 120, n. 3, p. 847-854, 2003.

TEDESCO, L.S.; FUSELER, J.; GRISHAM, M.; WOLF, R.; ROERIG, S.C. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. *Pain*, Amsterdam, v. 95, n. 3, p. 215-223, feb. 2002.

TEGEDER, I.; NIEDERBERGER, G.V.; VETTER, G.; BRÄUTIGAM, L.; GEISLINGER, G. Effects of selective COX-1 and COX-2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E<sub>2</sub> release in the spinal cord. *J. Neurochem.*, Oxford, v. 79, n. 4, p. 777-786, nov. 2001.

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.

TOKUNAGA, A.; SAIKA, M.; SENBA, E. 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 349-355, jun. 1998.

TOMINAGA, M. & CATERINA, M.J. Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.*, New York, v. 61, n. 1, p. 3-12, oct. 2004.

TONUSSI, C.R. & FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 421-417, mar. 1992.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 101, n. 4, p. 983-990, oct. 2004.

VALLEDOR, A.F.; XAUS, J.; COMALADA, M.; SOLER, C.; CELADA, A. Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 164, n. 1, p. 29-37, jan. 2000.

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

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.

VIVANCOS, G.G.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 138, n. 7, p. 1351-1357, apr. 2003.

WAJIMA, Z.; HUA, X.Y.; YAKSH, T.L. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 877, n. 2, p. 314-321, sep. 2000.

WANG, H.Q.; KIM, M.P.; TIANO, H.F.; LANGENBACH, R.; SMART, R.C. Protein kinase C- $\alpha$  coordinately regulates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> 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.

WAY, K.J.; CHOU, E.; KING, G.L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v. 21, n. 5, p. 181-187, may. 2000.

WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 229-238, feb. 1990.

WHELAN, C.J.; HEAD, S.A.; POLL, C.T.; COLEMAN, R.A. Prostaglandin (PG) modulation of bradykinin-induced hyperalgesia and oedema in the guinea-pig paw effects of PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>. *Agents Actions Suppl.*, Basel, v. 31, p. 107-111, 1991.

WHELAN, C.J.; PAYNE, A.N.; PLANQUOIS, J.M. A comparison of the inhibitory effects of budesonide, beclomethasone dipropionate, dexamethasone, hydrocortisone and tixocortol pivalate on cytokine release from leukocytes



recovered from human bronchoalveolar lavage. *Inflamm. Res.*, Basel, v. 48, n. 4, p. 224-228, apr. 1999.

WILLIAMS, T.J. Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 65, n. 3, p. 517-524, mar. 1979.

WILLIAMS, T.J. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E<sub>2</sub> as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 77, n. 3, p. 505-509, nov. 1982.

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

WOOD, J.N. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. *Gut.*, London, v. 52, S. 2, p. ii9-12, mar. 2004.

WOOD, J.N. & DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, Palo Alto, v. 59, p. 457-482, 1997.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 140, n. 6, p. 441-451, mar. 2004.

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.

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandins synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, apr. 1991.

XU, G.Y.; HUANG, L.Y.; ZHAO, Z.Q. Activation of silent mechanoreceptive cat C and Delta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. *J. Physiol.*, London, v. 528, Pt. 2, p. 339-348, oct. 2000.

YAMAKI, K. & OHUCHI, K. Participation of protein kinases in staurosporine-induced interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 127, n. 6, p. 1309-1316, jul. 1999.

YAMAMOTO, T. & NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res.*, Amsterdam, v. 739, n. 1-2, p. 104-110, nov. 1996.

YAMAMOTO, T. & NOZAKI-TAGUCHI, N. Role of spinal cyclooxygenase (COX)-2 on thermal hyperalgesia evoked by carrageenan injection in the rat. *Neuroreport.*, London, v. 8, n. 9-10, p. 2179-2182, jul. 1997.

YAMASHITA, M.; ASHINO, S.; OSHIMA, Y.; KAWAMURA, S.; OHUCHI, K.; TAKAYANAGI, M. Inhibition of TPA-induced NF-kappaB nuclear translocation and production of NO and PGE<sub>2</sub> by the anti-rheumatic gold compounds. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 55, n. 2, p. 245-251, feb. 2003.

YANG, C. & KAZANIETZ, M.G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 602-608, nov. 2003.

ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E<sub>2</sub> production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, v. 283, n. 3, p. 1069-1075, dec. 1997.

ZHU, X. & EISENACH, J.C. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 99, n. 5, p. 1175-1179, nov. 2003.

ZIGANSHINA, L.E.; ZIGANSHIN, A.U.; HOYLE, C.H.; BURNSTOCK, G. Acute paw oedema formation induced by ATP: re-evaluation of the mechanisms involved. *Inflamm Res.*, Basel, v. 45, n. 2, p. 96-102, feb.1996.

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