

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
Campus de Botucatu

Lidyane Regina Gomes Castor

Propriedades Químicas e Farmacológicas da
Apocinina, Vanilina e Ácido Vanílico

BOTUCATU – SP

2013

LIDYANE REGINA GOMES CASTOR

**Propriedades Químicas e Farmacológicas da Apocinina,
Vanilina e Ácido Vanílico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, Farmacologia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BOTUCATU – SP

2013

Dedicatória

*Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela sabedoria concedida e pela força e fé
que me mantiveram durante este percurso...agradeço a Deus por tudo!*

*"Nunca desista da vida
Tudo é possível ao que crê
Sempre existe uma saída
Deus Não se esqueceu de você*

*Dedico esta tese a minha filha Júlia, que da sua maneira inocente e alegre,
soube me ajudar nos momentos difíceis desta caminhada....*

*Amor de mãe vence preconceitos,
supera os limites, enfrenta todos os desafios
e te ajuda a vencer.. Amor de mãe, só
Deus para entender. Simplesmente amor!*

*Aos meus pais Regina e Odair, por me darem amor e apoio, durante toda minha
vida*

*".... Se um dia, já homem feito e respeitado sentires que a terra cede a teus
pés, que tuas obras se desmoronaram, que não há ninguém à tua volta para
estender a mão, esquece a maturidade, passa a tua mocidade, volta à tua
infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que
sempre te restarão na alma:*

Meu pai, minha mãe..." (Rui Barbosa)

Agradecimentos

À minha irmã Viviane pelo seu amor e carinho e por ser a "tia" mais coruja da Júlia

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela paciência, compreensão, ensinamentos e principalmente pela confiança na execução deste trabalho.

Ao coordenador do curso da Pós-Graduação Prof. Dr. Luiz Carlos Dstasi, pela compreensão no meu estado de saúde.

A Profa Dra Clélia Hiruma Lima, pelo apoio e incentivo sempre presente.

A Profa Dra Noeli P Rocha, pelos ensinamentos, incentivo, apoio e amizade incondicional nos momentos difíceis.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, que de uma forma direta ou indireta, me fizeram crescer durante todo o período que estive no Depto de Farmacologia.

Ao meu amigo, pai da minha filha e companheiro de laboratório, Paulo César Mioni pelo apoio e ajuda sempre presente.

Aos meus "vizinhos" de laboratório: Enio, Ricardo, Vanessa, Juliana e. Fernanda pela ajuda sempre presente e a companhia nos congressos....

A minha amiga Caterine Massucato, pelo apoio no início do doutorado...nunca vou me esquecer....

Ao meu amigo-irmão Elton Machado, pelo carinho e amizade sempre presente.

Ao meu coordenador, Márcio Pinheiro Machado, pelo apoio e palavras de incentivo e ao meus amigos "Nasfianos" a equipe mais alegre e "briguenta" de Botucatu vçs são demais!

As amigas especiais: Alice Oliveira, Juliana Martini, Lucília Basile, Viviane Arruda, Luciana Fioretto, pelo apoio, incentivo e risadas....amo vçs!

Ao meu amigo "personal computer" Reinaldo Dalanesi, o que faria sem sua ajuda?!

A minha amiga Janete, que é mais do que uma funcionária na farmacologia, pelo apoio, amizade e carinho... sentirei saudades!

Aos funcionárias do departamento de farmacologia: Cris e Luiz.

A Capes pelo auxílio financeiro.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

Resumo

Apocinina é o mais empregado inibidor de NADPH oxidase, um complexo multienzimático capaz de catalisar a redução unieletrônica do oxigênio molecular ao radical ânion superóxido. Apesar de controvérsias sobre sua seletividade, a apocinina tem sido utilizada como um das mais promissoras drogas em diversos modelos experimentais de inflamação. Neste estudo nosso objetivo foi caracterizar as características antioxidantes, pró-oxidantes e antinociceptivas da apocinina e dos compostos estruturalmente relacionados vanilina e ácido vanílico. Descobrimos que estes compostos são relativamente fracos como antioxidantes. Por outro lado, a apocinina e a vanilina, mas não o ácido vanílico mostraram significativas características pró-oxidantes. No que diz respeito aos efeitos antinociceptivos em ratos, a administração oral de 100 mg/Kg de apocinina, vanilina e ácido vanílico, uma hora antes dos testes, foi capaz de reduzir significativamente o edema da pata provocada por carragenina e a dor no teste de formalina (fase inflamatória) A apocinina foi também capaz de reduzir o efeito nociceptivo induzido por capsaicina, cinamaldeído, mentol e glutamato. Utilizando antagonistas específicos, descobrimos que a via serotoninérgica, mas não a via mediada por óxido nítrico está envolvida no mecanismo de antinocicepção da apocinina. Concluímos que não há relação entre as propriedades antioxidantes, pró-oxidantes, inibição de NADPH oxidase e os efeitos antinociceptivos estudados. Assim, os efeitos farmacológicos obtidos para a apocinina é uma confirmação de que este composto fitoquímico é muito mais do que um inibidor de NADPH oxidase. Estudos adicionais deverão ser realizados, mas as propriedades antiinflamatórias e antinociceptivas obtidas neste trabalho e os efeitos já descritos na literatura é um indicativo que esta molécula simples e barata se tornará um real anti-inflamatório e/ou analgésico.

Palavras-chaves: inflamação, dor, NADPH oxidase, metóxi-catecóis, antioxidantes, pró-oxidantes.

Abstract

Apocynin is the most employed inhibitor of NADPH oxidase, a multienzymatic complex capable of catalyzing the one-electron reduction of molecular oxygen to the superoxide anion. Despite controversies about its selectivity, apocynin has been used as one of the most promising drugs in several experimental models of inflammatory diseases. In this study our aim was to characterize the antioxidant, pro-oxidant and antinociceptive properties of apocynin and the structurally-related compounds vanillin and vanillic acid. We found that apocynin, vanillin and vanillic acid are poor antioxidants. Conversely, apocynin and vanillin, but not vanillic acid, showed significant pro-oxidant characteristics. Regarding antinociceptive effects in rats, the oral administration of 100 mg/Kg of apocynin, vanillin and vanillic, one hour before the tests, was able to reduce significantly the paw edema pain provoked by carrageenan and the pain in the formalin test (inflammatory phase). Apocynin was also able to reduce the nociceptive effect induced by capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and glutamate. By using specific antagonists, we found that serotonergic, but not the nitric oxide pathway seems to be involved in the mechanism of antinociception of apocynin. In conclusion, there is no relationship between antioxidant, pro-oxidant, inhibition of NADPH oxidase and the antinociception effects observed in these studies. Hence, the pharmacological effects obtained for apocynin is a confirmation that this phytochemical is much more than an NADPH oxidase inhibitor. Additional studies must be done, but the anti-inflammatory and antinociceptive properties of apocynin obtained in this work and the effects described in the literature are indicative that this simple and inexpensive molecule will become a real anti-inflammatory and analgesic drugs.

Key words: Inflammation, pain, NADPH oxidase, methoxy-cathecals, antioxidants, pro-oxidants.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAPH: cloridrato de 2,2-azobis (2-amidinopropano)
AEBSF: fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzossulfonila
AC: adenilato-ciclase
AINES: anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA: Análise de variância
APO: Apocinina
ASICs: Canais iônicos sensíveis ao ácido
COXs: ciclooxigenases
CAT: catalase
COX: ciclooxigenase
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DPI: difenileno iodônio
DTPA: ácido dietilenotriaminopentacético
DTNB: Ácido, 5, 5' ditiobis (2-nitrobenzóico)
DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EROs: espécies reativas de oxigênio
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético
g: grama
GTP: Trifosfato de guanosina
GMPc: Guanosina monofosfato cíclico
G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH: glutathione
GSSG: glutathione oxidada
GSSH: glutathione reduzida
5HT-1: 5-hidroxitriptamina (serotonina)
h: hora
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HOCl: ácido hipocloroso
HDL: proteína de alta densidade
HL-60: células humanas de leucemia promielocítica
HRP: peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*)
IL-1: interleucina 1
IL-6: interleucina 6
I/R: isquemia e reperfusão
Kg: kilograma
ICAM-1: moléculas de adesão intracelular-1
IL1-β: Interleucina-1- β
i.p.l: intraplantar
i. p: intraperitoneal
LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ tipos de leucotrienos
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano
L-ARG: L- arginina
L-NAME: éster metílico de N-Nitro-L-arginina

mg: miligramas
ml: mililitro
mM: milimolar
mmol/l: milimol por litro
min: minutos
 μ M: micromolar
 μ l: microlitro
MPO: mieloperoxidase
NK: natural-killer
NO: óxido nítrico
NOS: enzima óxido nítrico sintase
•NO: radical óxido nítrico radical
NADPH-oxidase nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidase
NEM: *N*-etilmaleimida
NF-kappa B: fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
NADH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-reduzida
Na₂HPO₄: fosfato de sódio tribásico
NKA: Neurocinina A
NKB: Neurocinina B
NMDA: receptores *N*-metil-*D*-aspartato.
nm: comprimento de onda
nmol: nanomol
O₂^{•-}: radical ânion superóxido
•OH: radical hidroxila
ONOO⁻: peroxinitrito
OPA: aldeído *orto*-ftálico
PAF fator de agregação plaquetária
PKG: proteína quinase G
PLC: Fosfolipase C
PCPA: *p*-clorofenilalanina
PBS: salina Tampão Fosfato
PGE₂:prostaglandina E2
CoQ: coenzima Q
ROS: radicais livres
s: segundos
s.c: sub-cutânea
SOD: Superóxido dismutase
SDS: dodecilsulfato de sódio
SP: substância P
TNF- α :fator de necrose tumoral
TBARS: substâncias reativas ao ácido barbitúrico
TRPV1:receptor de potencial transitório vanilóide 1
TRPA1:receptor de potencial transitório relacionado a proteína anquirina 1
TRPM8:receptor de potencial transitório melastatina 8
v.o: via oral
VCAM-1:molécula de adesão celular-1
VAS3947: triazol de pirimidina

Sumário

Lista de Figuras.....	12
1- INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Inflamação	18
1.2 Dor.....	21
1.3 Inflamação e Estresse Oxidativo	25
1.4 NADPH Oxidase e Inflamação	27
1.5 Antioxidantes e inflamação	28
1.6 Propriedades pró-oxidantes e ação farmacológica.....	32
1.7 Inflamação, NADPH oxidase e apocinina.....	34
1.8 Atividade pró-oxidante da apocinina.	38
2. Justificativa e Objetivos	39
3- Material e Métodos	41
3.1 Animais.....	41
3.2 Reagentes Químicos	41
3.3 Oxidação de glutathione por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos.....	42
3.4 Consumo de oxigênio durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos	42
3.5 Oxidação de grupos sulfidril em albumina de ovo por radicais gerados durante a apocinina e compostos correlatos	43
3.6 Oxidação de NADH por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos.....	44
3.7 Oxidação de trolox por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos	44
3.8 Oxidação da rifampicina por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos.....	45
3.9 Redução do radical livre DPPH por apocinina e compostos correlatos	45
3.10 Reatividade da apocinina e compostos correlatos com radicais peroxila.....	46
3.11 Avaliação do edema de pata.	46
3.12 Teste das contorções abdominais	47
3.13 Teste da placa quente.....	47
3.14 Teste da retirada da cauda (tail-flick).....	48
3-15 Hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Cg).....	48
3.16 Teste da Formalina	49
3.17 Participação do óxido nítrico, no efeito antinociceptivo da apocinina.....	50
3.18 Participação do sistema serotoninérgico, no efeito antinociceptivo da apocinina.	51
3.19 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	51
3.20 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.	52
3.21 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.	52
3.22 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.	52
3.23 Análise Estatística	53
4- Resultados (Estudos Bioquímicos)	53
4.1 Avaliação de Atividade Antioxidante (DPPH).....	53
4.2 Avaliação de Atividade Antioxidante (AAPH)	54
4.3 Propriedades Pró-oxidantes	56
4.3.1 Propriedades Pró-oxidantes: Oxidação de GSH.....	58

5- Discussão (Características Antioxidantes e Pró-oxidantes).....	68
6- Resultados (Estudos Farmacológicos)	73
6.1 Edema de pata	73
6.2 Teste das contorções.....	76
6.3 Testes da placa quente e da retirada da cauda (Tail-Flick).....	77
6.4 Teste da formalina	78
6.5 Hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.....	80
6.6 Estudo dos possíveis mecanismos de ação da apocinina.....	83
6.6.1 Avaliação da participação de óxido nítrico (NO).....	83
6.6.2 Avaliação da possível participação do via serotoninérgica	84
6.6.3 Avaliação da possível participação dos receptores 5HT- ₁ e 5HT- ₃ na atividade antinociceptiva da apocinina.....	86
6.6.4 Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	88
6.6.5. Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído	89
6.6.6. Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol	90
6.6.7. Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato	91
7- Discussão (Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos).....	92
8- Discussão Integradora (Resultados bioquímicos e farmacológicos)	103
9- Conclusões	105
10-Referências Bibliográficas	106

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química da apocinina e correlatos.	40
Figura 2. Reação entre um composto fenólico qualquer e o radical livre DPPH.	54
Figura 3. Formação de radical peroxila pela termólise de AAPH e interação com a sonda fluorescente piranina.	55
Figura 4. Perfil cinético de oxidação de piranina por radicais peroxila e fase lag provocada pela adição de metóxi-catecóis ou trolox. A reação controle consistiu de uma mistura de 5 μ M piranina, 20 mM AAPH em PBS a 37°C. Os resultados representam médias de três experimentos.	56
Figura 5. Esquema de atuação de polifenóis como anti ou pró-oxidantes.	57
Figura 6. Geração de radicais livres de apocinina por meio de oxidação catalisada por HRP.	58
Figura 7. Oxidação de GSH mediado por radicais de metóxi-catecóis. A reação controle consistiu em uma mistura de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H ₂ O ₂ . Apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Veja material e métodos para maiores detalhes. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicata. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle.	59
Figura 8. Produção de GSSG durante a oxidação de GSH mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação controle consistiu de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H ₂ O ₂ . Quando presentes, apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. O produto GSSG foi derivatizado com 0.1% OPA e analisado por HPLC com detecção fluorescente. (i) padrão GSSG 0,1 mM, (ii) reação controle, (iii) reação com apocinina, (iv) reação com vanilina e (v) reação com ácido vanílico.	60
Figura 9. Consumo de oxigênio dissolvido durante oxidação de GSH mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação controle consistiu em uma mistura de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H ₂ O ₂ . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Os resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas.	61
Figura 10. Oxidação de grupos sulfidrilas (SH) em ovalbumina mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação consistiu numa mistura (positivo controle) de 1 % (w/v) ovalbumina, 0.01 μ M	

HRP, 10 μM H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μM . Os resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle positivo. Controle negativo refere-se a concentração relativa de grupos sulfidrilas antes da oxidação. 62

Figura 11. Alteração espectral durante a oxidação de NADPH mediada pelo radical apocinina. A reação controle consistiu em uma mistura de 100 μM NADPH, 0.01 μM HRP, 10 μM H_2O_2 . Quando presente, apocinina foi adicionado na concentração de 10 μM . Os espectros foram obtidos num intervalo de 30s. 63

Figura 12. Oxidação de NADH mediada por radicais metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação. (B) velocidade relativa da oxidação de NADH. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM NADH, 0.01 μM HRP e 10 μM H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μM . Os resultados são apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle. 64

Figura 13. Oxidação do trolox mediada pelo radical apocinina. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM trolox, 0.01 μM HRP e 10 μM H_2O_2 . Quando presente, apocinina foi adicionados na concentração de 5 μM . Escaneamentos foram obtidos em intervalos de 30s. 65

Figura 14. Oxidação de trolox mediado por radicais metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação (B) Velocidade relativa da oxidação do trolox . A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM trolox, 0.01 μM HRP e 10 μM H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μM . Resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. (Os) Resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle. 66

Figura 15. Oxidação da rifampicina mediada por metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação da rifampicina. (B) Velocidade relativa da oxidação da rifampicina. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM rifampicina, 0.01 μM HRP, and 50 μM H_2O_2 in 0.1 μM HRP, and 50 μM H_2O_2 numa mistura de 100 μM rifampicina, 0.01 μM HRP, and 50 μM H_2O_2 in 0.1 M tampão fosfato pH 5.4. Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 50 μM . Os resultados estão apresentados como média e SD de experimentos em triplicata. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle. 67

Figura 16. Caracterização da apocinina como molécula com características pró-oxidantes..... 72

Figura 17. Efeito antiedematogênico da apocinina (100mg/kg, v.o.) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 73

Figura 18. Efeito antiedematogênico da vanilina (100mg/kg, v o.) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05)..... 74

Figura 19. Efeito anti-edematogênico do ácido vanílico (100mg/kg, v.o.) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 74

Figura 20. Efeito antiedematogênico da apocinina, vanilina e do ácido vanílico (100mg/kg, v.o.) no modelo de indução de edema de pata por carragenina. Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 75

Figura 21. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina, ácido vanílico todos na dose de (100 mg/kg, v.o),no teste das contorções (tempo de latência em segundos). As barras representam os valores de média ± erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 76

Figura 22. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de (100 mg/kg, v.o), no teste da placa quente (tempo de latência em segundos). As barras representam os valores de média ± erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença significativa em relação em relação ao controle (p<0.05). 77

Figura 23. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de (100 mg/Kg, v.o), no teste da placa quente (tempo de latência em segundos). As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença significativa em relação em relação ao controle ($p < 0.05$). 78

Figura 24. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico (100mg/Kg, v.o) no teste da formalina (fase neurogênica). As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 79

Figura 25. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico (100mg/Kg, v.o) no teste da formalina (fase inflamatória). As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 79

Figura 26. Avaliação antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 80

Figura 27. Avaliação antinociceptiva da vanilina (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 81

Figura 28. Avaliação antinociceptiva do ácido vanílico (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 81

Figura 29. Avaliação antinociceptiva da apocina, vanilina e ácido vanílico (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão desvio padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). 82

Figura 30. Avaliação da participação do óxido nítrico na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) no teste da formalina. As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 84

Figura 31. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o), no teste da formalina. As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 85

Figura 32. Avaliação da participação do receptor 5H-1 na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) no teste da formalina. As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). Ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 86

Figura 33. Avaliação da participação do receptor 5HT-3 na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/Kg, v.o) no teste da formalina. As barras representam os valores de média $\pm$ padrão da média (n= 6-8). As porcentagens indicam a ação anti-nociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05). 87

Figura 34. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Teste T de Student (p<0,01). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. 88

Figura 35. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Teste T de Student (p<0,01). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. 89

Figura 36. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol. Teste T de Student (p<0,01). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle 90

Figura 37. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Teste T de Student ($p < 0,01$). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle 91

1- INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

Dentre a diversidade de doenças existentes na humanidade destacam-se os processos inflamatórios, os quais estão intimamente relacionados a praticamente todos os processos patológicos, incluindo alergias (Naik & Wala, 2013), artrite (Lee, 2013), câncer (Abu-Amer, 2009), diabetes (Martins *et al.*, 2010), doenças neurodegenerativas (Czirr & Wyss-Coray, 2012)), doenças cardiovasculares (Libby *et al.*, 2002; Konishi., 2010) doenças reumáticas (Albers *et al.*, 2005), obesidade (Mangge *et al.*, 2010), senilidade (Khansari *et al.*, 2009; Laurson *et al.*, 2010), entre outras.

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após o dano celular seja qual for a sua etiologia como microrganismos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas (Abbas *et al.*, 2000). Após a agressão tecidual, seguem-se fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina, tendo como resultado um aumento localizado e imediato da irrigação sanguínea, que se traduz em um halo avermelhado em torno da lesão, hiperemia ou rubor. Em seguida, tem início uma produção local de mediadores inflamatórios que promovem um aumento da permeabilidade capilar e também quimiotaxia, processo químico pelo qual células polimorfonucleares e macrófagos são atraídos para o foco da lesão (Goltstein *et al.*, 1977., Fletcher, 1993., Sherwood e Toliver-Kinski, 2004). Estas células realizam a fagocitose dos elementos que estão na origem da inflamação e contribuem para a produção de mediadores químicos, tais como histamina, bradicinina, ativação do sistema complemento, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas,

interleucinas, quimiocinas e leucotrienos, etc. Cada um desses mediadores exercem funções fundamentais no processo inflamatório (Robinson, 1989)

. Especificamente:

- **Histamina:** É considerado o principal mediador da fase imediata do aumento da permeabilidade vascular. É o mediador que inicia a vasodilatação.
- **Bradicinina:** É um mediador importante nos primeiros estágios da fase tardia da permeabilidade vascular. Sua ação consiste na dilatação arteriolar, aumento da permeabilidade das vênulas, dor e quimiotaxia para os leucócitos.
- **Sistema de coagulação:** A trombina responsável pela expressão de moléculas de adesão do endotélio, produção de quimiocinas, PAF (fator ativador plaquetário), óxido nítrico e indução de ciclooxigenases.
- **Metabólitos do ácido araquidônico:** Derivados de fosfolípidios e ácidos graxos liberados nas membranas plasmáticas pela agressão. São considerados metabólitos locais de curto alcance. Formam-se rapidamente e exercem seus efeitos localmente. Na seqüência, se decompõe espontaneamente ou por ação enzimática. Ocorrem em todos os tecidos. Modulam a resposta inflamatória e são produzidos principalmente pela atividade de neutrófilos e macrófagos. Provavelmente responsável pela fase tardia e prolongada da permeabilidade vascular. O metabolismo do ácido araquidônico pode ocorrer por meio de duas classes principais de enzimas:
 - **Via ciclooxigenase:** Os produtos desta via são as prostaglandinas e tromboxanos. Entre elas:
 - PGI₂ (prostaciclina): vasodilatação e agregação plaquetária
 - PGE₂ (prostaglandina E₂): vasodilatação, potencialização do edema e da dor promovidos pela bradicinina

e modulação da função de macrófagos e células NK.

- **Via da lipoxigenase:** Os produtos desta via são os leucotrienos.

- LTB₄ (Leucotrieno B₄): quimiotaxia para leucócitos e aumento da permeabilidade vascular;

- LTC₄, LTD₄, LTE₄(Leucotrieno C a E₄): aumento da permeabilidade vascular;

- **Citocinas pró-inflamatórias:** São proteínas produzidas por vários tipos celulares, mas principalmente por macrófagos e linfócitos ativados. Desempenham efeitos diversos sobre diferentes células, modulando a sua função. As mais conhecidas são IL-1, IL-6 e TNF- α (fator de necrose tumoral). TNF- α e IL1 promovem a ativação metabólica de neutrófilos e macrófagos, ativação angiogênica das células endoteliais, efeitos sistêmicos como (febre, perda do apetite, pelo aumento na liberação dos lipídios e proteínas, liberação de neutrófilos na circulação, etc), efeitos hemodinâmicos do choque séptico especialmente, hipotensão, redução da resistência vascular, aumento da frequência cardíaca e redução do pH do sangue (Vinay *et al.*, 2005). O processo pelo qual estes mediadores alcançam o foco inflamatório é mediado por fatores de adesão que são expressos na superfície das células endoteliais que revestem internamente os vasos sanguíneos. Estes fatores irão mediar a adesão e a diapedese de monócitos circulantes e outras células inflamatórias para o local da lesão. Em resumo, todos estes fatores atuam em conjunto, levando aos eventos celulares e vasculares da inflamação (Kawai *et al.*, 2006). De um ponto de vista macroscópico, estes eventos resultam em um aumento do diâmetro de capilares responsáveis pela irrigação sanguínea local, produzindo hiperemia e aumento da temperatura local (rubor). O edema ou inchaço ocorre a

partir do aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular aos componentes do sangue, o que leva ao extravasamento e líquidos intravasculares para o espaço intersticial extracelular.

1.2 Dor

A dor, outro sintoma característico da inflamação, é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável relacionada com a lesão tecidual real ou potencial (Loeser & Melzack, 1999). A partir desta definição, pode-se citar componentes fisiológicos, psicológicos e emocionais. A junção dos mesmos é o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, em animais avalia-se a dor de forma indireta. Uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional, avalia-se somente o componente fisiológico, ao qual se denomina nocicepção (Tjolsen & Hole, 1997). Os estímulos nocivos ou lesivos promovem uma ativação de receptores periféricos, os nociceptores, que traduzem tais estímulos em impulsos elétricos e os transmitem para o corno dorsal da medula espinhal e posteriormente para o cérebro (Dray *et al.*, 1994). Existem três modalidades de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Reichling & Levine, 1999). Entre o estímulo nocivo e inicial e a consciência dolorosa existe uma extraordinária série de mecanismos complexos e interativos pelos quais o estímulo inicial é transmitido e processado pelos centros superiores (Millan, 1999). Os nociceptores, que podem ser ativados pelos estímulos dolorosos, estão localizados nas terminações nervosas livres das fibras aferentes primárias (Devor, 1999). As fibras aferentes primárias nociceptivas podem ser classificadas em três tipos: fibras A δ , fibras A β e fibras C. Em condições normais, os três tipos de fibras podem

transmitir informações não nociceptivas, mas somente fibras A δ e as fibras C transmitem informação nociceptiva (Konietzny e Hensel, 1975 & Millan, 1999), a alodínia também pode ser transmitida pelas fibras A β . A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de estímulos químicos, térmicos ou mecânicos, resulta na liberação local de mediadores químicos tais como bradicinina, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, aminoácidos excitatórios, NO entre outros. Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a propagação do sinal nociceptivo graças a um aumento na permeabilidade da membrana neuronal a cátions e conseqüente geração do potencial de ação (Coutaux *et al.*, 2005).

A formação de prostanóides pelas COXs é um dos responsáveis pela sensação de dor (Masferrer *et al.*, 1994). As prostaglandinas sensibilizam terminais nociceptivos periféricos e produzem uma sensibilidade aumentada a dor. Além das prostaglandinas, sabemos que o NO e a serotonina são importantes mediadores nociceptivos importantes da nocicepção. O NO é um importante mensageiro biológico que é sintetizado a partir da L-arginina pela sintase de óxido nítrico (NOS). O NO exerce seus efeitos intracelulares por ativar a guanilato-ciclase solúvel, que por sua vez converterá GTP em GMPc, e este, como segundo mensageiro poderá ativar a PKG (proteína quinase G), canais iônicos e fosfodiesterases. OseK *et al.* em 2003 afirmam que o NO é produzida pós-sinápticamente à ativação de aminoácidos excitatórios principalmente o glutamato que é encontrado nas fibras C. A ativação da NOS apresentam papel fundamental na transmissão nociceptiva da medula espinhal até o centros superiores (Bleakman *et al.*, 2006). Inibidores de NOS são capazes de inibir indiretamente receptores ionotrópicos glutamatérgicos como os receptores de NMDA (receptores N-metil-D-aspartato).

A serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina que também está envolvida na modulação da dor (Millan, 2002). A ativação de fibras descendentes serotoninérgicas correlaciona-se com a concomitante ação de 5-HT de forma pró-nociceptiva, vias descendentes facilitatórias, e antinociceptiva, vias descendentes inibitórias (Sawynok & Reid, 1996; Millan, 1999). O núcleo magno da rafe é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante na modulação do controle descendente da transmissão da dor (Basbaum & Fields, 1984; Millan, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de serotonina são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (Carter & Sullivan, 2002; Millan, 2002).

Dependendo do tipo de receptor predominantemente, o resultado final de sua ativação pode ser a supressão ou facilitação da nocicepção. Ainda, um mesmo tipo ou subtipo de receptor serotoninérgico pode ter ações diversas conforme sua localização. A literatura acerca deste assunto mostra que a 5-HT pode ter efeito pró-ou antinociceptivo, conforme o sítio onde ela é aplicada, o modelo experimental escolhido e a dose utilizada (revidado por Millan, 2002). Existem evidências de que a 5-HT aumenta a ação das vias descendentes inibitórias adrenérgicas, revelando um sinergismo das atividades das duas vias descendentes inibitórias na produção da analgesia (Fürst, 1999). Além disso, é classicamente conhecido que as projeções descendentes serotoninérgicas exercem um efeito inibitório marcante sobre a transmissão nociceptiva (Basbaum & fields, 1984; Alhaider, 1991a, 1991b). As vias descendentes inibitórias serotoninérgicas modulam a transmissão nociceptiva tanto por atuarem diretamente sobre os neurônios de projeção, como através de interneurônios (Alhaider *et al.*, 1991b).

Os receptores para a 5-HT são classificados nos seguintes tipos e subtipos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ (Bardin, 2000). Os diferentes mecanismos de transdução de sinal de cada tipo de receptor serotoninérgico permitem a observação de efeitos distintos da 5-HT sobre a atividade neuronal. No que se refere à participação dos receptores serotoninérgicos no controle da nocicepção, pode-se dizer que os tipos mais bem estudados são 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃. Os receptores 5-HT_{1A}, por exemplo quando localizados nos neurônios de projeção, exercem efeito inibitório sobre a atividade neuronal, devido ao seu acoplamento negativo à AC e indução da abertura de canais de K⁺ (Boess & Martin, 1994). Portanto, esses receptores têm papel importante na analgesia induzida por ativação das vias descendentes inibitórias serotoninérgicas a nível espinhal (Bardin *et al.*, 2000; Bardin *et al.*, 2001; Colpaert *et al.*, 2002). Os receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F} compartilham o mesmo mecanismo de transdução de sinal do receptor 5-HT_{1A}, possuindo influências igualmente inibitórias sobre a atividade neuronal. Estes três receptores estão intimamente relacionados quanto à localização, sendo que, em relação à atividade antinociceptiva, os receptores 5-HT_{1B} possuem atividade mais expressiva do que os outros dois (millan, 2002). Os receptores 5-HT₂ exercem uma influência excitatória sobre atividade neuronal, devido ao acoplamento positivo à PLC e atividade inibitória sobre correntes de K⁺ (Boess e Martin, 1994). Periféricamente eles apresentam atividades pró-nociceptivas, entretanto, o posicionamento de receptores, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} em interneurônios inibitórios transforma a sua ação pronociceptiva em um papel antinociceptivo (Bardin *et al.*, 2000; Obata *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001). Isto se deve ao fato de que a atividade das fibras aferentes primárias é modulada pela ação

de interneurônios inibitórios, encefalinérgicos ou GABA/glicinérgicos, que recebem inervação serotoninérgica descendente (Alhaider et al., 1991). O receptor 5-HT₃ distingue-se drasticamente das outras classes de receptores serotoninérgicos por ser um canal catiônico pentamérico operado por ligante. Sua ativação aumenta a atividade da PLC, reforçando sua influência facilitatória sobre a excitabilidade neuronal (Millan, 2002). Sua principal localização no corno dorsal é nas lâminas superficiais, e acredita-se que ele esteja também atuando nos interneurônios inibitórios, um vez que seus agonistas seletivos são capazes de induzir antinocicepção a nível espinhal (Sazaki et al., 2001).

Neste sentido, vemos que tanto a inflamação quanto a dor, são processos inter-relacionados e multicomplexos onde estão envolvidos vários mediadores químicos, neurotransmissores, assim como várias vias de sinalização nociceptivas.

1.3 Inflamação e Estresse Oxidativo

Outro evento da maior relevância nos processos inflamatórios é a capacidade das células fagocíticas, tais como neutrófilos e macrófagos, e não fagocíticas, tais como células endoteliais, em produzir e secretar as denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical ânion superóxido (O₂^{•-}), óxido nítrico (•NO), radical hidroxila (•OH), ácido hipocloroso (HOCl), entre outros, e que lhes confere alta capacidade microbicida e tumoricida. Como pode ser notado alguns EROs são radicais livres. Este termo é usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente e que contenha um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Esta característica é responsável pela alta reatividade destas substâncias as quais podem abstrair prótons ou elétrons de biomoléculas promovendo a sua oxidação. Exemplos de radicais livres de origem endógena são o O₂^{•-}, •NO, •OH (Barreiros et al., 2006).

Apesar de suas características deletérias largamente conhecidas, as EROs são produzidos continuamente durante processos metabólicos e atuam como mediadores em várias reações bioquímicas, desempenhando funções imprescindíveis na proteção imunológica e no sistema vascular. Trata-se, por exemplo, da regulação de tônus vascular via produção de $\bullet\text{NO}$ ou da já conhecida função do H_2O_2 como mediadores nas vias de sinalização celular (Ferreira *et al.*, 1997).

Entre as vias de produção destes oxidantes destacam-se:

- 1- Ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase, que transfere elétrons da coenzima NADPH para o oxigênio, formando o radical ânion superóxido;
- 2- Dismutação do radical ânion superóxido levando a produção de peróxido de hidrogênio;
- 3- Produção de radical hidroxila via reação de Fenton;
- 4- Produção de óxido nítrico por meio da ação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS);
- 5- Produção de peroxinitrito (ONOO^-) por meio da reação entre o radical ânion superóxido e o óxido nítrico;
- 6- Produção de ácido hipocloroso por meio da ação catalítica da enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos

O termo estresse oxidativo está relacionado ao desequilíbrio na produção e/ou neutralização de EROs no meio celular. Isto pode ocorrer pelo aumento na produção destes oxidantes, ou por alguma deficiência nos mecanismos fisiológicos de detoxificação dos mesmos. No contexto dos processos inflamatórios, onde células estimuladas por agentes exógenos ou endógenos produzem estes oxidantes em grande quantidade, é comum associar o dano tissular à destruição de proteínas, enzimas e estruturas lipídicas no foco inflamatório

pelas suas interações com HOCl, $\bullet$ OH, ONOO⁻, etc. Dentre as doenças onde danos oxidativos têm sido relacionados com a sua etiologia ou progressão pode-se citar: artrite, aterosclerose, diabetes, cardiopatias, disfunções cerebrais, entre outras (Bianchi & Antunes, 1999). De modo semelhante, o dano nas bases nitrogenadas causados pela produção exacerbada de EROs tem sido postulado como um componente da maior importância nos processos de mutagênese e carcinogênese (Toyokuni, *et al.*, 1995; Seril *et al.*, 2003).

1.4 NADPH Oxidase e Inflamação

Como descrito acima, o sistema NADPH oxidase é um componente de grande relevância na mediação dos processos inflamatórios. Este complexo multienzimático é composto pelas proteínas citossólicas p47phox, p67phox, Rac1 e Rac2 e pelo componente de membrana flavocitocromo b558 composto de gp91phox e p22phox (Rosen *et al.*, 1998). No que diz respeito aos fagócitos, quando ativados por patógenos, partículas opsonizadas, imunocomplexos etc., ocorrem mudanças na conformação dessas proteínas, de tal forma que sítios de ligação, até então inacessíveis, são expostos levando a migração e agregação dos componentes para membrana do fagossomo nascente. Este complexo tem um forte poder catalítico, levando à redução do oxigênio a ânion superóxido em uma taxa de 2 nmol/min por 10⁶ neutrófilos (Nauseef, 2004). A fonte continua de NADPH para os fagócitos é a via das hexoses monofosfato. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a primeira enzima desta via (“hexose monophosphate shunt”), onde a glicose-6-fosfato (Glicose-6-P) é convertida para 6-fosfogluconato (6-PG) e NADP⁺ é reduzida para NADPH, que é a coenzima necessária para a geração de superóxido via o sistema NADPH oxidase (Ardati *et al.*, 1997)

O complexo NADPH oxidase é expresso em vários tecidos/células. Em particular, sua presença em células endoteliais nos vasos sanguíneos trouxe à tona sua importância nas patologias cardiovasculares. Exemplos disso são os estudos que indicam que a ativação do complexo NADPH oxidase está relacionada a doenças de origem inflamatória, disfunção endotelial e apoptose (Wei *et al.*, 2007). Outros trabalhos demonstram o envolvimento da NADPH oxidase com o desenvolvimento da hipertensão (Puddu *et al.*, 2008), câncer (Uchio-Fukai & Nakamura, 2008) e diabetes (Ha *et al.*, 2008). Da mesma forma, demonstrou-se que o complexo NADPH oxidase está intimamente relacionado com a doença de Alzheimer (Wilkinson & Landreth, 2006).

1.5 Antioxidantes e inflamação

Sendo a formação endógena de EROs um componente essencial na gênese e/ou progressão dos processos inflamatórios, são inúmeros os trabalhos que buscam em compostos, tanto sintéticos como naturais, propriedades antioxidantes e que possam ser potencialmente úteis em aplicações terapêuticas. Uma definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato endógeno oxidável, é capaz de inibir a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Sies & Stahl, 1995). Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entre os enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e enzimas de reparo. Entre os não enzimáticos incluem-se o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, proteínas do plasma, selênio e glutathione (Droge, 2003., Halliwell & Cross, 1994).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas impedindo o ataque dos mesmos sobre lipídeos, aminoácidos em proteínas, duplas ligações em ácidos graxos poliinsaturados e em bases de DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Sendo assim, substâncias com propriedades antioxidantes são constantemente estudadas, dado seus potenciais como agentes terapêuticos para inúmeras patologias. Alguns antioxidantes de grande relevância e aplicações importantes são:

- Vitamina C

Possui efeitos anti-inflamatórios e esta associada à redução da disfunção endotelial em pessoas com histórico de doenças cardiovasculares ou diabetes (Wannamethee, 2006). A combinação de β -caroteno (15mg/dia), vitamina C (50mg/dia) e vitamina E (400mg/dia) por seis semanas pode ser usada como tentativa na clínica na para o tratamento de hiperlipidemia em fumantes e para eliminar o estresse oxidativo e dano celular (Chao *et al.*, 2002).

β -caroteno

Trata-se da pró-vitamina A e evidências epidemiológicas sugerem que os carotenóides do soro são potenciais antioxidantes e que tem um papel protetor no desenvolvimento de doenças crônicas. Alguns estudos mostram que a concentração de β -caroteno em tecidos adiposos estava significativamente mais baixa em pacientes que tiveram infarto do miocárdio do que nos controles (Krause, Mahan, 2005; Coyne *et al.*, 2005). O β -caroteno é altamente lipossolúvel e transportado

largamente com o colesterol LDL (75%) e com colesterol HDL (25%). Possui função antioxidante de captador de radicais livres, para reduzir a extensão de injúria nuclear e para inibir a peroxidação lipídica induzida pelas enzimas fontes de radicais livres, como a xantina-oxidase (Chao, 2002).

Flavonóides

Atuam como antioxidantes na desativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (Hartman & Shankel, 1990). Os flavonóides mais investigados são quercetina, miricetina, rutina e naringerina (Hartman & Shankel, 1990). A quercetina, miricetina e a rutina, foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (Noroozi *et al.*, 1998). Outros flavonóides como a (-)-epicatequina e (-)-epigallocatequina apresentam tanto propriedades antioxidantes como inibidores do processo de carcinogênese (Mukherjee *et al.*, 1997). Os flavonóides atuam também induzindo ou inibindo enzimas como ciclooxigenase, lipoxigenase ligadas a processos inflamatórios e também enzimas do sistema citocromo oxidase. Alguns sugerem o uso da casca escura do grão de soja (rico em antocianinas) como um complemento útil para modular desordens cardiovasculares (Kim *et al.*, 2006). Neste estudo foi examinada a inibição da expressão de alguns genes inflamatórios associados com isquemia/reperfusão (I/R) provocada pela injúria. Antocianinas isoladas da casca escura do grão de soja diminuíram os níveis vasculares de molécula de adesão celular-1 (VCAM-1), moléculas de adesão intracelular-1

(ICAM-1) e níveis de ciclooxigenase-2, induzidas pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), os quais são dependentes da via NF-kappa B. Outros estudos demonstraram que os compostos polifenólicos inibem os processos de inflamação vascular que contribuem para o aparecimento de doenças cardiovasculares. Sugere-se que esses efeitos sejam mediados pelas alterações na síntese dos eicosanóides celulares. Em um estudo verificaram-se os efeitos das pró-antocianinas do cacau na alteração na síntese dos eicosanóides em humanos e em células aórticas *in vitro*. Os resultados demonstraram que os indivíduos que consumiram chocolate rico em pró-antocianinas apresentaram um aumento de 32% nos níveis de prostaciclina e uma diminuição de 29% dos leucotrienos. Além disso, as pró-antocianinas diminuíram em 58% a razão leucotrienos-prostaciclina das células *in vitro* e 52% das células *in vivo*. Os autores sugerem que quantidades significativas de flavonóides podem alterar favoravelmente a síntese de eicosanóides em humanos, fornecendo hipóteses plausíveis para o mecanismo que diminui a agregação plaquetária (Schramm *et al.*, 2001).

Vitamina E

Especificamente, a fração α -tocoferol é um das mais importantes antioxidantes nas células para proteção da injúria oxidativa. Desse modo a vitamina E atua na prevenção da lipoperoxidação das membranas biológicas (Ibrahim *et al.*, 1999, Mahan, 2005). Segundo o estudo de John *et al.*, 2001, o tratamento com vitamina E reduz a lipoperoxidação em ratos intoxicados e as atividades da SOD, CAT e GSH aumentaram em ratos intoxicados com pesticidas. Outro estudo realizado por

MacDonald-Wicks & Garg, 2003, apresentou evidências do papel antioxidante da vitamina E em ratos, em situação de estresse.

1.6 Propriedades pró-oxidantes e ação farmacológica

Em linhas gerais, atividade pró-oxidante está relacionada à capacidade de uma molécula, um metal de transição, ou qualquer mecanismo molecular em exacerbar um processo oxidativo (Decker, 1994) diversos compostos estão descritos na literatura científica que apresentam tanto propriedades antioxidantes como com propriedades pró-oxidantes, sejam eles de origem sintética, vegetal ou até mesmo endógeno. Outro ponto ainda mais relevante neste contexto é que ser pró-oxidante não significa necessariamente algo deletério ao organismo e é comum que tal propriedade esteja relacionada aos efeitos farmacológicos de muitas substâncias. Por exemplo, Duarte-Almeida *et al.*, 2006 demonstraram que o ácido ascórbico no sistema β -caroteno/ácido linoléico apresenta atividade pró-oxidante e esta foi proporcional à sua concentração. Isso ocorreu porque o ácido ascórbico, após doar os dois hidrogênios redutores, ficou passível de receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante (Bors *et al.* 1997; Hassimoto *et al.* 2005).

Uma outra substância endógena com atividade pró-oxidante relatada é o α -cetoglutarato, o qual é capaz de induzir um significativo aumento na produção basal de TBARS no modelo desoxirribose/peróxido de hidrogênio. Lambert *et al.*, 2010 demonstraram que a atividade pró-oxidante da *Camellia sinensis* (Chá-verde), está relacionada com a apoptose e citotoxicidade de células tumorais de camundongos quando submetidos a este tratamento. Corroborando com este estudo, Bejarano *et al.*, 2010 demonstraram que a melatonina possui uma capacidade pró-oxidante, cujo efeito está

associado a uma citotoxicidade e efeitos pró-apoptóticos em tumores humanos de células mielóides HL-60. Suphim *et al.* 2010 demonstraram, em seus estudos, que a curcumina também apresenta características pró-oxidantes e estas propriedades estão diretamente relacionadas ao extenso estresse oxidativo que culmina em efeitos pró-apoptóticos e citotóxicos em células tumorais de câncer biliar. As antocianinas aciladas extraídas do rabanete vermelho possuem propriedades pró-oxidantes que podem causar um aumento no dano oxidativo celular em DNA, devido ao acúmulo de EROs e uma subsequente apoptose, podendo assim diminuir o metabolismo de células cancerígenas. Ahmad *et al.*, 2007 observou que o tratamento de células leucêmicas com resveratrol (4-8 μ M) inibiu a cascata de ativação e fragmentação do DNA induzida pela incubação com H₂O₂. Nestas concentrações, o resveratrol mostrou propriedades pró-oxidantes que foram evidenciadas pelo aumento da concentração intracelular de radical ânion superóxido.

Outra substância com propriedades pró-oxidantes é a menadiona (vitamina K₃). Nutter, em 1992, mostrou que a menadiona aumenta a geração de radical hidroxila nas células do câncer de mama humano MCF-7, provocando quebra da dupla hélice do DNA nestas células. Foram propostos dois mecanismos de ação primários para explicar a citotoxicidade da vitamina K₃. Um é o estresse oxidativo através da cascata de oxirredução da estrutura das quinonas, gerando espécies reativas tóxicas de oxigênio e o outro mecanismo é pela arilação direta dos tióis intracelulares provocando drástica queda dos níveis de glutathione e inibição de proteínas dependentes de sulfidril. A vitamina K₃ gera semiquinonas, radical ânion superóxido e H₂O₂, provocando depleção da glutathione, peroxidação lipídica e clivagem do DNA (Gant *et al.*, 1988)

A vitamina C e a vitamina K₃ administradas na razão de 100:1 exibem atividade antitumoral sinérgica e preferencialmente matam as células tumorais por auto-crise (Jamison

et al., 2001) Esta combinação de vitaminas induz o bloqueio da divisão celular na fase G1/S, diminui a síntese de DNA, aumenta a produção de radical ânion superóxido e de H_2O_2 , diminuí severamente os níveis de glutathione e de outros tióis celulares. Neste ínterim, ocorre aumento de 8 a 10 vezes na quantidade intracelular de cálcio ionizado. As vitaminas K_3 e C aumentam o estresse oxidativo até ele se sobrepor à defesa antioxidante endógena incluindo a glutathione. Neste momento, ocorre a liberação de cálcio ionizado o qual ativa a DNAase dependente de cálcio que provoca a clivagem de DNA (Noto *et al.*, 1989; Gilloteaux *et al.*, 1998)

No contexto acima, a vitamina C, que é um clássico agente antioxidante, também apresenta atividade pró-oxidante. Osieck *et al.*, 2010 estudaram a ação intra e extracelular da suplementação de ácido ascórbico em células de leucemia mielóide KG1a durante um período de cultura de 24 horas após adição do mesmo. Em 24 horas, observaram que a suplementação com vitamina C até 250 μ M, apresentou atividade intracelular antioxidante. Entretanto, quando estas mesmas culturas foram avaliadas em 2 ou 4h foi observado uma atividade pró-oxidante nas concentrações mais elevadas de AA (> 100 μ M), indicando que o resultado foi tempo-dose-dependente. Paradoxalmente, observaram que a atividade pró-oxidante intracelular e da atividade antioxidante extracelular podem ocorrer simultaneamente. Eles sugeriram que estes resultados indicam que a “exata” atividade da suplementação de vitamina C varia em função da dose, tempo e localização celular.

1.7 Inflamação, NADPH oxidase e apocinina

Pode-se afirmar que ainda não se dispõe de um do fármaco anti-inflamatório e analgésico ideal, com efeitos colaterais mínimos e que seja realmente eficaz para os fins

que se aplicam. Atualmente utiliza-se tanto corticóides, opióides, inibidores da ciclooxigenase-2, antidepressivos tricíclicos, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). . Na terapêutica clássica, os AINES (salicilato, ibuprofeno, naproxeno, dipirona, piroxicam, entre outros) e opióides (morfina e seus derivados) ainda são os mais utilizados na clínica médica. Os AINES constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas eficazes, mas infelizmente, com alta incidência de efeitos adversos. Seu principal mecanismo de ação é inibição da COX, que culmina na diminuição da síntese de prostaglandinas (Vane, 1995., Khan & Dionne, 2002). Os principais efeitos adversos dos AINES são: hemorragias, irritação e úlcera gástrica, falência renal e hepática, reações cutâneas, agranulocitose e crises asmáticas. Da mesma maneira, embora os opióides sejam muito efetivos, principalmente na dor aguda, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos adversos como constipação, náuseas, vômitos, bronco-constrição e depressão respiratória (Mc Queen, 1983). Além disso, a tolerância aos opióides se instala rapidamente e a dependência física é visível após poucos dias de tratamento (Nestler, 1993).

Neste sentido, com o entendimento cada vez mais avançado da fisiopatologia dos processos inflamatórios, tem-se sugerido outros níveis de atuação ou estratégias na busca de novos fármacos anti-inflamatórios, dirigidos ao controle de mecanismos específicos relevantes à resposta inflamatória. Assim, considerando a presença e relevância da NADPH-oxidase em diversos tecidos e sua ligação com várias doenças de origem inflamatória, esta passou a ser considerada um alvo terapêutico. Dentro deste contexto, surge a apocinina. Trata-se do composto 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, também conhecido como acetovanilona e que foi originalmente isolado de uma planta nativa do Himalaia, a *Picrorhiza kurroa*, sendo utilizada na medicina popular para asma, icterícia e

problemas no fígado e coração. Simons *et al.*, 1990, isolaram a apocinina e observaram que ela atuava como inibidor do complexo NADPH oxidase e também possuía propriedades anti-inflamatórias. Desde então, a apocinina é amplamente utilizada em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* como um potente e não tóxico inibidor da ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase em fagócitos e células endoteliais (Muijsers *et al.*, 2000; Worm *et al.*, 2001). Uma rápida busca em bases de dados especializadas mostrará que a maioria dos trabalhos que utilizam a apocinina, o fazem quando querem evidenciar o envolvimento do complexo NADPH oxidase em processos e/ou vias de sinalização celular. Como exemplo, pode-se citar o efeito da apocinina na asma e outras doenças respiratórias e que pode estar relacionado à inibição da formação de peroxinitrito (Peters *et al.*, 2001). Outro estudo demonstrou que a administração oral de apocinina causou um efeito protetor sobre a cartilagem de camundongos em modelos de artrite induzida por zymosan (Hougee *et al.*, 2005). Em modelos de isquemia/reperfusão e lesão pulmonar, a administração de apocinina diminui significativamente a atividade da NADPH oxidase, o nível de superóxido e atenua o número de infartos (Tang *et al.*, 2007). Outros modelos onde a apocinina tem sido utilizada incluem aterosclerose (Holland *et al.*, 1997), alergia (Muijsers *et al.*, 2001), isquemia (Paterniti *et al.*, 2010), osteoartrite e artrite reumatóide (Lafeber *et al.*, 1999), hipertensão (Taylor *et al.*, 2006) e câncer (Kless *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao mecanismo de ação da apocinina, embora este não esteja totalmente provado, parece envolver a metabolização da mesma por meio da ação catalítica da enzima mieloperoxidase e a conseqüente geração de um produto dimérico. Este último impediria a agregação e translocação para a membrana dos componentes citossólicos do complexo NADPH oxidase (Barbieri *et al.*, 2004).

No entanto são crescentes as dúvidas sobre a sua eficácia e seletividade no que diz respeito à inibição do complexo NADPH oxidase. Grande parte desta controvérsia reside exatamente no fato de que há a necessidade de metabolização da mesma por pela mieloperoxidase, pois células não fagocíticas não possuem esta enzima e assim não poderiam ser ativadas como descrito acima. Recentemente Wind *et al.* 2010 comparou a atividade inibitória de NADPH oxidase da apocinina, com outros compostos como o difenileno iodônio (DPI), fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzossulfoníla (AEBSF) e também o triazol de pirimidina (VAS3947). O estudo consistiu em detectar a formação de EROs em células A7r5 de ratos e células humanas HL-60. Neste trabalho, o autor conclui que a apocinina e o DPI não foram tão específicos em inibir a NADPH oxidase se comparado ao AEBSF e VAS3947.

Outro ponto que chama a atenção em relação a apocinina como molécula simples e de grande potencial de aplicação como anti-inflamatório é a sua semelhança com moléculas como a vanilina e o ácido vanílico. Apesar da grande semelhança estrutural entre a apocinina e os compostos citados, estes últimos não são utilizados como inibidores do complexo NADPH oxidase em modelos experimentais. Para nós isso é realmente surpreendente, pois a vanilina (essência de baunilha) é uma substância extremamente utilizada, inclusive como aditivo em alimentos. Adicionalmente, Worm Der *et al.* 2001 observaram que a capacidade inibidora da produção de superóxido por neutrófilos estimulados era praticamente a mesma para a apocinina e a vanilina. Este mesmo trabalho demonstrou que o ácido vanílico, por sua vez, foi pouco efetivo como inibidor.

1.8 Atividade pró-oxidante da apocinina.

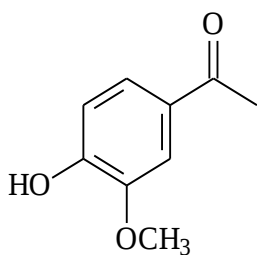
A apocinina, que como descrito acima, é utilizada como inibidora da ativação do complexo NADPH oxidase e tem sido relatada também como uma substância com ação pró-oxidante. Por exemplo, estudos recentes reportam que a apocinina inibe a fosforilação de Akt levando à supressão de metástase em câncer de pulmão. Os autores também demonstraram que a apocinina inibiu a atividade enzimática da fosfoinositídeo 3-quinase. A apocinina diminui a razão da glutathiona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) em monócitos estimulados por zimosan opsonizado (Barbieri *et al.*, 2004). Em células gliais, a apocinina induz um aumento significativo nos níveis de malonodialdeído, lactato desidrogenado, peróxido de hidrogênio e diminui a razão GSH/GSSH de uma maneira dose-dependente (Riganti *et al.*, 2006). Em fibroblastos vasculares, apocinina estimula a produção de ROS ao invés de inibir a produção de ânion superóxido (Vejraska *et al.*, 2005). Em um estudo recente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que radicais de apocinina são capazes de oxidar diretamente GSH e induzir a formação de peróxido de hidrogênio (Ximenes *et al.*, 2008). Considerando os já relatados efeitos farmacológicos da apocinina, pode-se inferir que esta característica pró-oxidante possa estar de alguma forma relacionada a estes efeitos benéficos, embora ainda não exista uma prova deste fato.

2. Justificativa e Objetivos

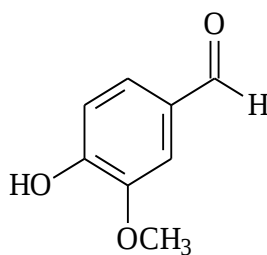
A apocinina possui uma estrutura molecular relativamente simples se comparada aos largamente conhecidos e estudados produtos de origem vegetal como ácidos fenólicos e flavonóides. No que diz respeito à sua capacidade antioxidante, ela pode ser considerada deficiente se comparada aos mesmos. Como neste projeto pretende-se estudar substâncias capazes de inibir processos oxidativos deletérios às células, seria natural imaginar que a capacidade de neutralizar radicais livres da mesma fosse de grande relevância. É justamente este paradigma que é quebrado pela apocinina, pois trata-se de uma das substâncias mais utilizadas quando o objetivo é inibir o complexo multienzimático NADPH oxidase, mesmo não possuindo um potencial antioxidante relatado e como descrito nas seções precedentes, mostrando-se pró-oxidante em alguns modelos experimentais. Deve-se destacar que a mesma é considerada um inibidor do complexo NADPH oxidase e não um “scavenger” do radical ânion superóxido, propriedade esta, que poderia ser melhor desempenhada pelos antioxidantes citados acima como ácido fenólicos e flavonoides. Esta característica especial da apocinina é ainda reforçada quando se compara a sua estrutura molecular com os compostos correlatos vanilina e ácido vanílico (Figura 1). Como pode ser notado, trata-se de moléculas muito semelhantes, porém a vanilina e ácido vanílico não são normalmente utilizados como inibidores do complexo multienzimático NADPH oxidase. Outro ponto que chama atenção para a apocinina é que, a despeito das controvérsias sobre sua seletividade e potência como inibidora do complexo multienzimático NADPH oxidase, são crescente as aplicações farmacológicas que tem surgido para a apocinina, e muitas vezes, ou na maioria das vezes, não se pode afirmar de forma categórica que estejam relacionados única e exclusivamente a inibição do complexo NADPH oxidase. Assim, o que há de tão especial na apocinina? Sua característica como inibidora do complexo NADPH oxidase às

outras propriedades anti-inflamatórias e/ou analgésicas? Estariam estes efeitos também relacionados às características anti ou pró-oxidante da apocinina? Dentro deste contexto, temos como objetivos específicos para este projeto:

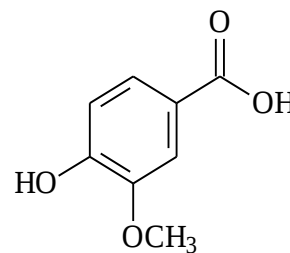
- 1- Estudar e comparar as propriedades químicas antioxidantes e pró-oxidantes dos metóxi-catecóis apocinina, vanilina e ácido vanílico.
- 2- Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo dos mesmos em modelos *in vivo*.
- 3- Avaliar se existe correlação entre os itens precedentes e caracterizar os possíveis mecanismos de ação.



apocinina



vanilina



ácido vanílico

Figura 1. Estrutura química da apocinina e correlatos.

3- Material e Métodos

3.1 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos albinos suíços machos (25-40 g) e ratos albinos suíços machos de 200-250 g provenientes do Biotério Central da UNESP/Botucatu e transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências, onde foram mantidos sob condições controladas de temperatura, luminosidade, umidade e dieta, por um período de sete dias antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais aprovados, previamente, pelo Comitê de Ética Experimental de Animais, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP (Protocolo 222).

3.2 Reagentes Químicos

Apocinina, vanilina, ácido vanílico, capsaicina, mentol, cinamaldeído, glutamato, WAY 100635, ondasetron peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), *L*-arginina, éster metílico de *N*-Nitro-*L*-arginina, (*L*-NAME), *p*-clorofenilalanina (PCPA), ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), rifampicina, carragenina, catalase, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), glutationa (GSH), glutationa oxidada (GSSG), aldeído *orto*-ftálico (OPA), *N*-etilmaleimida (NEM), cloridrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), piramina, trolox e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Piroxicam foi adquirido da Feldene Laboratórios (Pfizer Ltda). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi preparado por diluição de uma solução 30% e sua concentração determinada por sua

absorção em 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados para a preparação de tampões e soluções em geral foram de grau analítico. Os solventes para preparação de fases móveis foram de grau cromatográfico. A purificação da água para preparação dos reagentes e soluções foi realizada por osmose reversa (Quimis, SP, Brasil) seguido por resina de troca iônica do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.3 Oxidação de glutathione por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos

Uma solução de GSH (1 mM) foi incubada com H_2O_2 (100 μM) e HRP (0.1 μM) em PBS a 37°C na ausência (controle) ou presença dos compostos em estudo (10 μM). As reações foram iniciadas pela adição de H_2O_2 e finalizadas pela adição de catalase (10 $\mu\text{g/mL}$). A concentração remanescente de GSH foi quantificada como previamente descrito por Yang *et al.*, 2006, como segue: À mistura de reação (0,45ml) foi adicionado igual volume de uma solução de Na_2HPO_4 (300 mM) e 0,1 ml de uma solução de DTNB (solução aquosa contendo 0.2 mg/ml DTNB e 1% de citrato de sódio). A absorbância em 412 nm foi medida em relação ao branco contendo PBS (0,45 mL), Na_2HPO_4 (0,45 mL) e DTNB 0,1 mL. Uma curva analítica foi produzida utilizando padrões com concentrações conhecidas de GSH. As medidas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu, Japan).

3.4 Consumo de oxigênio durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos

O consumo do oxigênio molecular dissolvido na mistura de reação foi medido utilizando um monitor de oxigênio YSI 5300A (Yellow Spring, USA). A mistura de reação

foi constituída por GSH (1 mM), HRP (0.1 μ M) em PBS a 37C° na ausência (controle) ou presença dos compostos em estudo (10 μ M). A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (100 μ M) e o consumo de oxigênio foi monitorado por 5 minutos.

3.5 Oxidação de grupos sulfidril em albumina de ovo por radicais gerados durante a apocinina e compostos correlatos

A clara de ovo foi utilizada como fonte de albumina. Os seguintes tampões foram preparados para preparação da solução de albumina. Tampão Tris-glicina constituído por tris(hidroximetil)aminometano (0.1 M), glicina (0.1 M) e EDTA (4 mM). O pH foi ajustado para 8.0. Este tampão foi utilizado para preparação de uma solução 5% de SDS, o qual foi denominado tampão SDS-Tris-glicina; DTNB (4 mg/ml) foi preparado no tampão Tris-glicina. A solução de albumina foi preparada dissolvendo 1% da clara de ovo (p/v) em SDS-Tris-glicina, centrifugada a 1000 x g por 5 minutos e coletado o sobrenadante para análise.

Para a determinação da quantidade relativa de grupos sulfidril na albumina de ovo, misturou-se 500 μ l do sobrenadante com 500 μ l de SDS-Tris-glicina e 10 μ l da solução de DTNB. A mistura de reação foi incubada por 15 minutos a 40C°. Na seqüência, a absorbância da solução foi medida (412 nm) utilizando como branco o tampão SDS-Tris-glicina (Van der Planken *et al.*, 2005).

Para testar a reatividade dos metóxi-catecóis com os grupos sulfidril da albumina, o sobrenadante descrito acima foi encubado com HRP (10 nM) e H₂O₂ (10 μ M) na ausência ou presença dos compostos em estudo (10 μ M) por 15 minutos. A concentração relativa de grupos sulfidril remanescentes foi medido como descrito acima. Um espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu, Japan) foi usado para as medidas de absorbância nestes ensaios.

3.6 Oxidação de NADH por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos

Uma solução de NADH (100 μ M) foi incubada com H_2O_2 (10 μ M) e HRP (10 nM) em tampão fosfato (10 mM) pH 7.0 onde foi acrescentado o quelante DTPA (50 μ M) a 37C°. As reações foram realizadas na ausência (controle) ou presença dos compostos em estudo (10 μ M). A velocidade relativa de oxidação de NADPH foi medida pela variação de absorbância à 340 nm (Galati *et al.*, 2002). O branco foi constituído por tampão fosfato e metóxi-catecóis (10 μ M). Um espectrofotômetro de grade de diodos HP8452 (Agilent, USA) foi utilizado para avaliar a alteração espectral durante as reações.

3.7 Oxidação de trolox por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos

Uma solução de trolox (100 μ M) foi incubada com H_2O_2 (50 μ M) e HRP (10 nM) em tampão fosfato (10 mM) pH 7.0 onde foi acrescentado DTPA (50 μ M) a 37C°. As reações foram realizadas na ausência (controle) ou presença dos compostos em estudo (5 μ M). A velocidade relativa de oxidação do trolox foi medida pela variação de absorbância a 272 nm (Nunes Delicado *et al.*, 1997). O branco foi constituído por tampão fosfato e metóxi-catecóis (10 μ M). Um espectrofotômetro de grade de diodos HP8452 (Agilent, USA) foi utilizado para avaliar a alteração espectral durante as reações.

3.8 Oxidação da rifampicina por radicais gerados durante a oxidação da apocinina e compostos correlatos

Uma solução de rifampicina (100 μ M) foi incubada com H_2O_2 (100 μ M) e HRP (10 nM) em tampão fosfato 100 mM pH 5,5 a 25°C. As reações foram realizadas na ausência (controle) ou presença dos compostos em estudo (50 μ M). A velocidade relativa de oxidação da rifampicina foi medida pela variação de absorbância a 472 nm (Santos *et al.*, 2005). O branco foi constituído por tampão fosfato. Um espectrofotômetro de grade de diodos HP8452 (Agilent, USA) foi utilizado para avaliar a alteração espectral durante as reações.

3.9 Redução do radical livre DPPH por apocinina e compostos correlatos

Os metóxi-catecóis (50 μ M) foram incubados em uma solução etanólica de DPPH (100 μ M) por 60 minutos a temperatura ambiente e ausência de luz. A absorbância em 517 nm foi medida em relação ao branco (álcool etílico) (Campos *et al.*, 2004). O trolox foi utilizado como referência de substância com reconhecido potencial antioxidante. A atividade supressora dos metóxi-catecóis em DPPH foi calculada como segue:

% atividade supressora = $((A_c - A_i) / A_c) \times 100$, onde A_c é a absorbância do DPPH na ausência das substâncias em teste e A_i é a absorbância de amostras onde os metóxi-catecóis foram adicionados.

3.10 Reatividade da apocinina e compostos correlatos com radicais peroxila

O composto fluorescente piranina (5 μ M) foi incubado com AAPH (20 mM) em PBS a 37°C na ausência (controle) ou presença dos metóxi-catecóis. A decomposição da piranina foi monitorada pelo decaimento de sua fluorescência (λ_{ex} 460 nm/ λ_{em} 510nm) (Campos *et al.*, 2004). Foi utilizado um fluorímetro adaptado para leitura em microplacas Spectramax M2 Microplate Reader (Molecular Devices, USA). O volume final da reação foi 300 μ l. A fase *lag* (retardo no decaimento da fluorescência) foi medida e correlacionada à concentração dos compostos em estudo.

3.11 Avaliação do edema de pata.

Com a finalidade de avaliar a possível atividade antiedematogênica dos compostos em estudo (apocinina, vanilina e ácido vanílico) foi utilizado o método de indução de edema de pata em ratos Wistar pela carragenina (Winter & Risley, 1962). Os animais (n=6-8) foram divididos em grupos: salina (controle), piroxicam (30 mg/Kg), apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de 100mg/Kg. Os tratamentos (compostos testes, salina e piroxicam) foram administrados por via oral, 1 hora antes da indução do edema pela injeção subcutânea de 100 μ l/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 μ l/ pata de salina estéril na pata esquerda. Nos tempos determinados (1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com o agente flogístico carragenina) fez-se a medição de ambas as patas em um pletismômetro (Ugo, Basile) e o resultado foi expresso pela diferença de volume deslocado (ml) entre as patas submetidas a administração de carragenina e salina (controle)

3.12 Teste das contorções abdominais

Este teste permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam em nível central ou periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,8 % v/v) diluído em solução salina (Sal, 0,9 % de NaCl). Grupos de camundongos foram pré-tratados por via oral com os compostos estudados: apocinina, vanilina e ácido vanílico, na dose de 100 mg/kg, salina (controle), piroxicam (30mg/kg, v.o) como controle positivo, 1 hora antes da injeção de solução de ácido acético. Após a injeção de ácido acético os camundongos foram colocados sob funis de vidro invertido com espelho ao fundo e foram observados para a contagem do número de contorções cumulativamente durante 20 minutos.

As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente (Bentley et al., 1981).

3.13 Teste da placa quente.

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar o tempo de latência sobre a placa aquecida de acordo com o método descrito anteriormente por (Eddy e Leimbach, 1953), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa quente foi mantido a $54 \pm 1^\circ\text{C}$. Grupos de camundongos foram tratados via oral com os compostos estudados: apocinina, vanilina e ácido vanílico, na dose de 100 mg/kg, salina (controle) e morfina (5 mg/Kg s.c.) como controle positivo e após 1 hora os animais foram colocados em um cilindro de vidro com 24 cm de diâmetro, sobre a superfície aquecida. O tempo decorrido entre a colocação do animal e o aparecimento das reações de balançar ou lambear as patas, ou ainda de subir na parede do cilindro foi registrado e considerado como índice de

latência. Um tempo máximo de 30s foi utilizado para prevenir possíveis danos teciduais (tempo de corte). Cada animal foi testado antes da administração das drogas a fim de obter uma resposta basal (latência basal) e foram utilizados somente animais que responderam à placa dentro de 15 segundos.

3.14 Teste da retirada da cauda (tail-flick)

O teste da retirada da cauda (tail-flick) foi realizado de acordo com o método descrito por D'amour e Smith (1941), com algumas modificações. Para medir a latência de retirada da cauda, a ponta da cauda dos camundongos foi imersa em um banho-maria de água à $48^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (estímulo térmico nociceptivo). Foi considerada resposta positiva o movimento brusco de retirada da cauda, isto é, o movimento reflexo de origem espinal e vigoroso. Um tempo de corte de 15 segundos foi estabelecido para minimizar a probabilidade de dano à pele. Grupos de camundongos foram tratados via oral com os compostos estudados (100 mg/kg) e morfina (5 mg/Kg s.c.) como controle positivo e após 1 hora foi realizado o experimento, sendo então cronometrado o tempo da latência da retirada da cauda.

3-15 Hiperálgia mecânica induzida pela carragenina (Cg)

Este método consiste em medir a sensibilidade dolorosa do animal. No dia do experimento, os animais foram divididos em grupos: salina, piroxicam (30 mg/Kg), apocinina nas doses de (100 mg/Kg), vanilina (100 mg/Kg) e ácido vanílico (100mg/Kg). Os tratamentos (composto teste ou salina) foram administrados por via oral, 1 h antes da indução do edema pela

injeção subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 µl// pata de salina estéril na pata esquerda. Nos tempos determinados (1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com o agente flogístico carragenina) fez-se a medição de ambas as patas. A intensidade de hiperalgesia mecânica foi quantificada utilizando-se o aparelho Basile Analgesimeter, pelo qual se exerce uma força mecânica que aumenta linearmente, de acordo com o método descrito por Randall & Sellito (1957). Uma pressão é aplicada através de uma peça cônica de plástico com uma ponta de cúpula, sobre o dorso da pata traseira do animal, apoiada sobre uma plataforma. O aparelho é acionado, através de um pedal, para o início da aplicação da força mecânica. Esta pressão aplicada na pata é interrompida quando o animal exibe um reflexo de retirada da pata. O reflexo de retirada realizado pelo animal, demonstra para o experimentador o momento em que o aparelho Basile Analgesimeter deve ser desligado (desacionado). Neste momento, registra-se a pressão em gramas aplicada pelo aparelho, suportada pelo animal. O limiar nociceptivo é definido como a força em gramas aplicada à pata do animal no momento em que este exibe o reflexo de retirada. É utilizado para determinar a intensidade de hiperalgesia mecânica sendo quantificada como a diferença (Δ) do limiar nociceptivo da pata direita (com carragenina) com a pata esquerda (salina).

3.16 Teste da Formalina

O teste da formalina foi utilizado para caracterizar a dor aguda. Este modelo possui uma resposta distinta (bifásica) de resposta de dor: Fase inicial: inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente 5 minutos da aplicação do agente nociceptivo. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), a qual sofre ação principalmente de drogas tipos opióides. Fase tardia: inicia-se entre 15-30 min

após administração de formalina e permanece por cerca de 60 min. Esta fase é indicativa de dor inflamatória e sofre ação de drogas do tipo AINEs. Este experimento foi baseado nas descrições de Hunskaar & Hole, 1987, com algumas modificações. Foram utilizadas câmaras de observação, que consistem em um cilindro de vidro com 20 cm de diâmetro sobre uma superfície transparente de acrílico. Abaixo desta superfície, foi colocado um espelho sob um ângulo de 45° para uma melhor observação das patas dos camundongos. Cada animal foi previamente colocado na câmara por 5 minutos antes do tratamento para permitir aclimação com o novo ambiente. Os camundongos foram pré-tratados com o controle (v.o.), piroxicam (30 mg/kg, v.o) e doses de 10 mg/Kg, 30 mg/Kg e 100 mg/Kg de apocinina. Enquanto os outros grupos experimentais foram pré-tratados com o controle (v.o.) piroxicam (30 mg/kg, v.o), vanilina e ácido vanílico somente na dose de 100 mg/Kg.

3.17 Participação do óxido nítrico, no efeito antinociceptivo da apocinina.

Em função do importante papel do óxido nítrico na dor e inflamação, avaliou-se a sua participação na antinocicepção dos compostos estudados. Os camundongos foram pré-tratados com *L*-arginina (substrato da síntese de NO) na dose de 500 mg/kg (i.p) 30 minutos antes dos tratamentos orais descrito anteriormente. Como um parâmetro do controle da reversão da antinocicepção da substância isolada, utilizou-se *L*-NAME (inibidor da síntese de NO) 65 mg/kg, administrados via intraperitoneal 30 minutos após a injeção de *L*-arginina (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005).

3.18 Participação do sistema serotoninérgico, no efeito antinociceptivo da apocinina.

Para avaliar a participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva dos compostos estudados, os camundongos foram pré-tratados com PCPA (inibidor da síntese de serotonina) na dose de 100 mg/kg, administrados via intraperitoneal, durante 4 dias consecutivos antes da realização do teste da formalina descrito anteriormente. Para investigar a participação dos receptores serotoninérgicos mais específicos, os animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com WAY100635 – 0,1 mg/kg (antagonista 5-HT_{1A}) - e ondansetron - 0,5 mg/kg (antagonista 5-HT_{3A}) 30 minutos antes do tratamento oral do experimento da formalina como descrito anteriormente (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005).

3.19 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

. O procedimento utilizado foi o descrito por Sakurada *et al* (1992), com pequenas modificações (Santos e Calixto, 1997 a, b). Os animais foram tratados com veículo (salina), apocinina (100mg/kg, v.o), 30 min antes da injeção de 20 µl de uma solução de PBS contendo capsaicina (1,6 µg/pata). Em seguida, os animais foram colocados em caixas de acrílico, e observados durante os 5 minutos subseqüentes. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 minutos e considerado com índice de nocicepção.

3.20 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.

. Os animais foram tratados com veículo (salina, v.o), apocinina (100mg/kg, v.o), 30 minutos antes da injeção intraplantar de 20 μ L da solução de cinamaldeído (10nmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído foi cronometrado por um período de 5 minutos e considerado com índice de nocicepção (Andrade et al., 2008).

3.21 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.

Os animais foram tratados com veículo (salina, v.o), apocinina (100mg/kg, v.o), 30 minutos antes da injeção intraplantar de 20 μ l da solução de mentol (1,2 μ mol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído foi cronometrado por um período de 5 minutos e considerado com índice de nocicepção.

3.22 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Os animais foram tratados com veículo (salina, 0,1ml/10g, v.o), apocinina (100 mg/kg, v.o), 30 minutos antes da injeção intraplantar de 20 μ l da solução de glutamato (20 μ mol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído foi cronometrado por um período de 15 minutos e considerado com índice de nocicepção.

3.23 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet para a análise dos grupos, para análise de dois grupos experimentais foi utilizado o test *T* de “*Student*”. Foi considerada diferença significativa de $p < 0,05$ e de $p < 0,01$

4- Resultados (Estudos Bioquímicos)

4.1 Avaliação de Atividade Antioxidante (DPPH)

Inicialmente os potenciais antioxidantes da apocinina e de seus correlatos foram avaliados por meio da capacidade dos mesmos como redutores do radical livre DPPH. Trata-se de um método clássico para avaliação de atividade antioxidante de substâncias puras e extratos vegetais e baseia-se na reatividade dos mesmos como o radical livre e estável DPPH, provocando o decaimento de sua absorbância em 517 nm (Campos *et al.*, 2004). A Figura 2 esquematiza, de forma genérica, a reação entre um composto fenólico e o radical livre DPPH. Assim, quanto maior a capacidade da substância em estudo como doadora de hidrogênio ou elétron ao DPPH, ou seja, promovendo a redução do mesmo, maior será a sua eficiência como neutralizador de radicais livres.

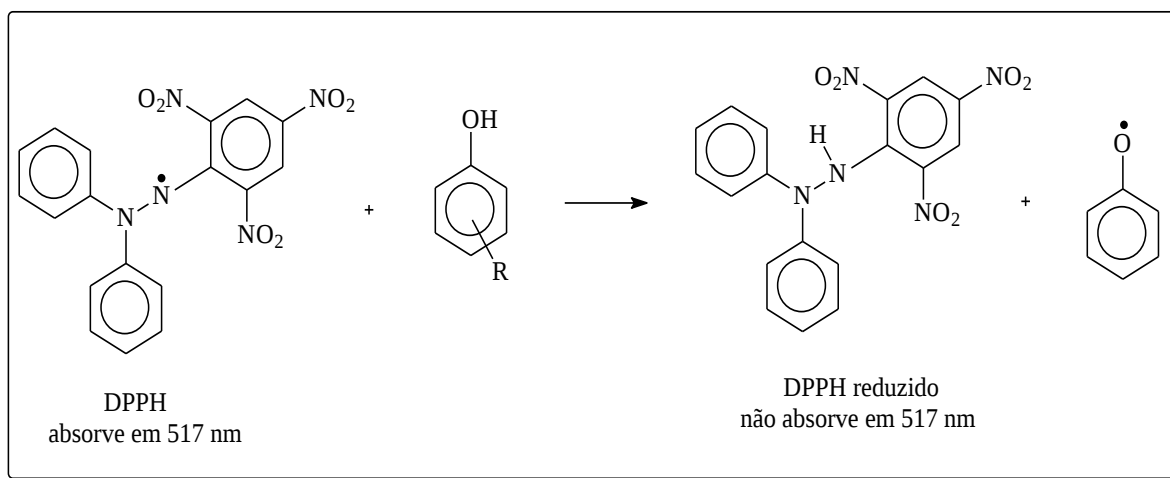


Figura 2. Reação entre um composto fenólico qualquer e o radical livre DPPH.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que os compostos aqui estudados são relativamente pouco eficientes se comparados ao trolox, um derivado solúvel de vitamina E largamente utilizado como referência de substância com grande capacidade antioxidante (Nunes Delicado *et al.*, 1997). Os dados também mostram que, embora pouco eficientes, entre os metóxi-catecóis estudados, o ácido vanílico foi o mais eficiente dos três.

Tabela 1. Metóxi-catecóis como redutores do radical livre DPPH

	Redução de DPPH (%)
Apocinina	6.9 ± 1.5
Vanilina	6.8 ± 0.7
Ácido vanílico	23.2 ± 4.8
Trolox	77.3 ± 0.9

A concentração dos antioxidantes foi 50 µM. Os resultados representam médias e desvio padrão de triplicatas.

4.2 Avaliação de Atividade Antioxidante (AAPH)

No intuito de comprovar os resultados obtidos utilizando o ensaio de redução de DPPH, os compostos em estudos foram submetidos ao ensaio de avaliação antioxidante baseado na capacidade dos mesmos em reduzir radicais peroxila. Neste ensaio analítico, o

radical peroxila é gerado pela termólise do azo composto AAPH e a monitoração de sua formação se dá pela oxidação da sonda fluorescente piranina, que tem como consequência a queda de sua fluorescência intrínseca. A Figura 3 apresenta a esquematização da formação de radicais peroxila por meio da termólise do azo composto AAPH. Também é mostrada a ação do mesmo sobre a sonda fluorescente piranina. Portanto, um bom neutralizador de radicais livres será aquela substância capaz de competir com a piranina pelos radicais peroxila e, desse modo, impedindo a sua degradação.

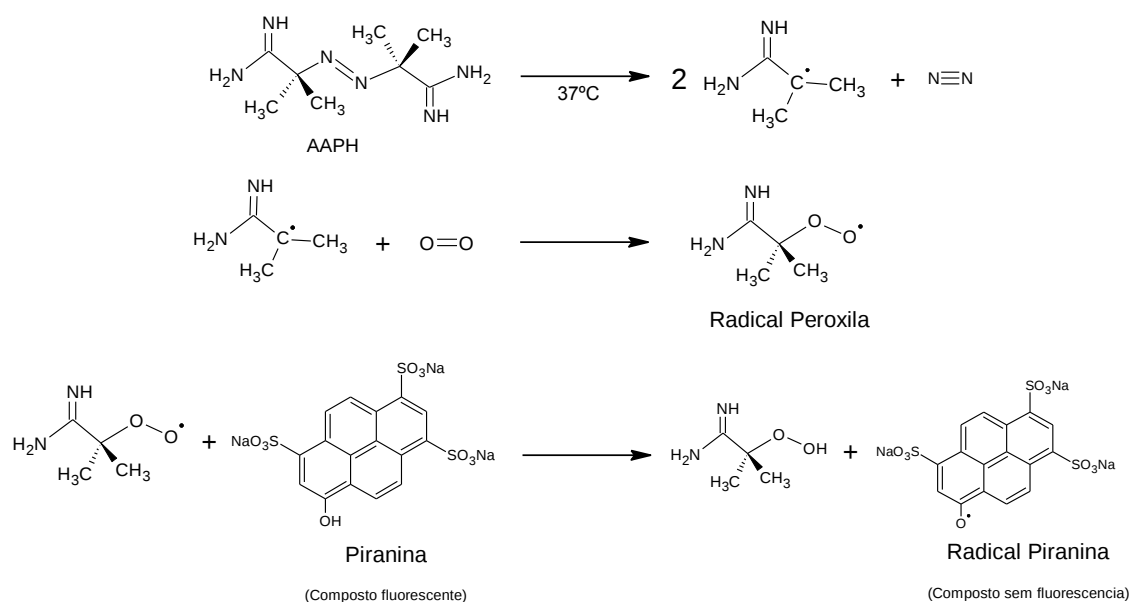


Figura 3. Formação de radical peroxila pela termólise de AAPH e interação com a sonda fluorescente piranina.

Neste ensaio, a concentração e a eficiência de substâncias antioxidantes são avaliadas pela inibição na oxidação da piranina, que se revela por uma fase de atraso (*lag*) na queda da fluorescência (Campos *et al.*, 2004). Como pode ser observado na Figura 4, o trolox (antioxidante de referência em nossos estudos) mostrou um efeito concentração-

dependente na indução da fase *Lag* durante a oxidação da piranina por radicais peroxila. Por outro lado, e confirmando os resultados anteriores, os metóxi-catecóis revelaram a sua baixa capacidade antioxidante. Novamente, entre os mesmos, o ácido vanílico se mostrou como melhor antioxidante.

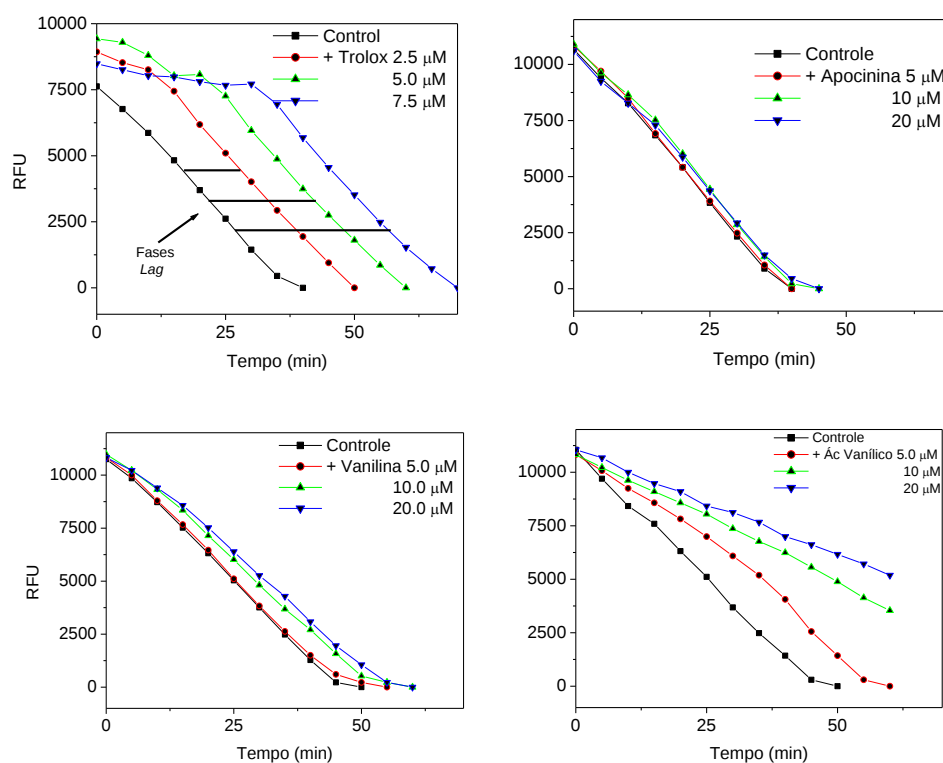


Figura 4. Perfil cinético de oxidação de piranina por radicais peroxila e fase lag provocada pela adição de metóxi-catecóis ou trolox. A reação controle consistiu de uma mistura de 5 μ M piranina, 20 mM AAPH em PBS a 37°C. Os resultados representam médias de três experimentos.

4.3 Propriedades Pró-oxidantes

Inicialmente deve-se esclarecer que a capacidade pró-oxidante de alguns compostos fenólicos tem sido descrita na literatura científica (Galati *et al.*, 2002). Especificamente no contexto aqui empregado, refere-se à capacidade de alguns radicais fenólicos, gerados como intermediários durante as suas oxidações, em promover a oxidação de outras

biomoléculas. Em outras palavras, atuam como co-catalisadores em processos oxidativos. Esta propriedade contrasta com uma atividade puramente antioxidante, onde os mesmos radicais se neutralizariam por posterior oxidação, dimerização, etc. A Figura 5 mostra um esquema diferenciando a ação antioxidante e pró-oxidante no contexto aqui empregado.

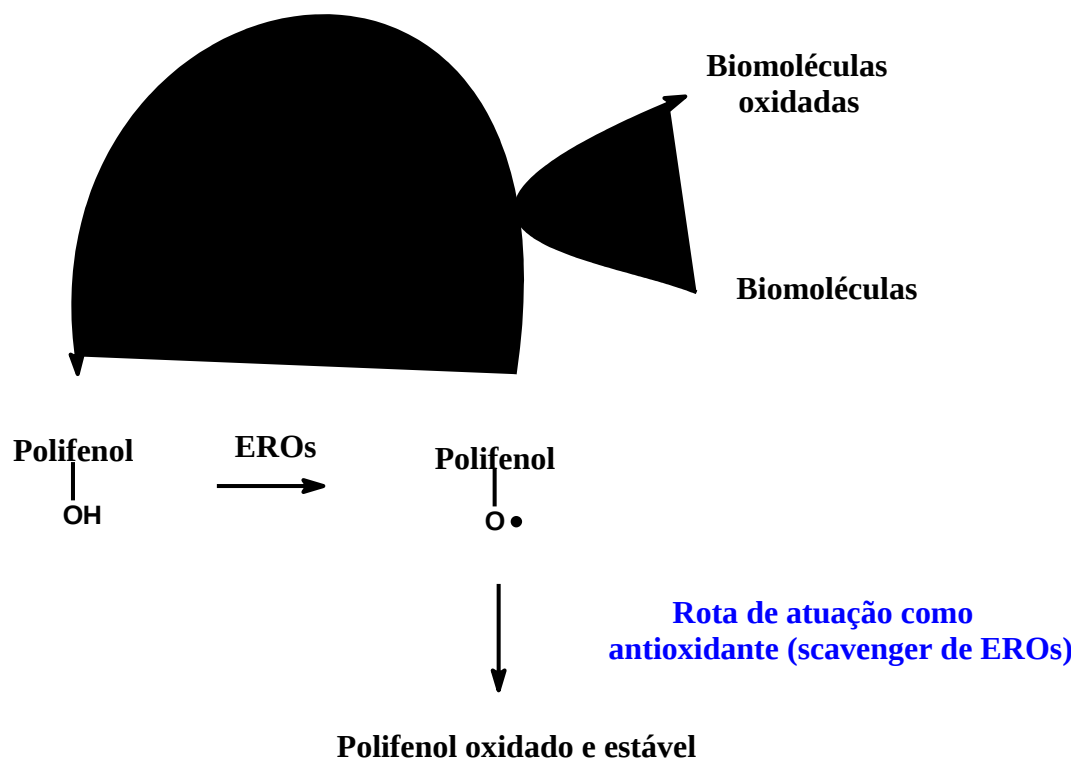


Figura 5. Esquema de atuação de polifenóis como anti ou pró-oxidantes.

Para avaliar se os metóxi-catecóis aqui empregado poderiam apresentar propriedades pró-oxidantes, visto que os mesmo foram fracos antioxidantes, lançamos mão de sua série de técnicas onde, após geração de radicais fenólicos intermediários, biomoléculas potencialmente alvos de espécies radicalares foram submetidas a ação dos mesmos. As biomoléculas e/ou modelos de biomoléculas utilizadas como possíveis alvos da ação pró-oxidante dos radicais livres dos metóxi-catecóis foram: glutathione, ovalbumina,

NADH, trolox e rifampicina, sendo que a razão de suas escolhas será esclarecida no momento oportuno.

Outro ponto importante neste contexto é como gerar os intermediários radicalares dos metóxi-catecóis. Para isso, lançamos mão do fato que estas moléculas podem ser facilmente oxidadas por peróxido de hidrogênio e uma reação catalisada por HRP (Figura 6).

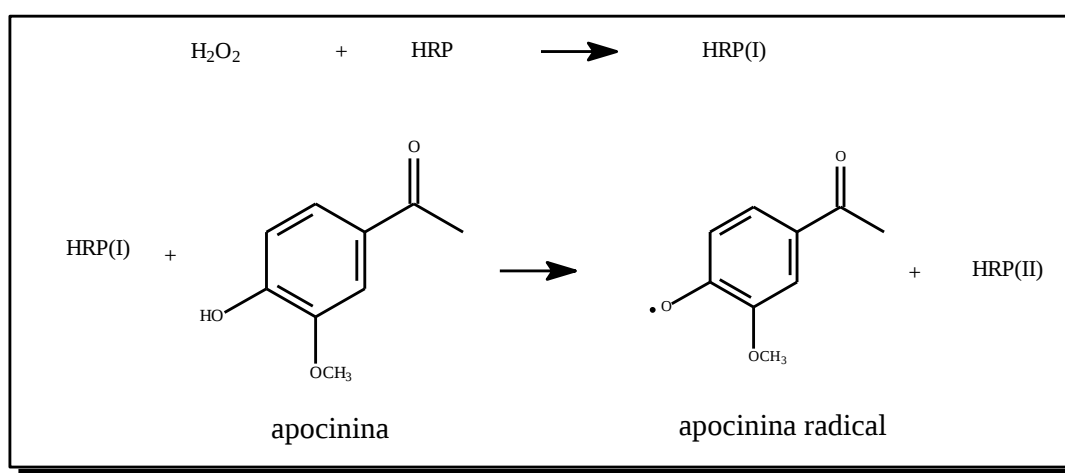


Figura 6. Geração de radicais livres de apocinina por meio de oxidação catalisada por HRP.

4.3.1 Propriedades Pró-oxidantes: Oxidação de GSH

A glutathiona (GSH) é um dos principais antioxidantes endógenos e presente em altas concentrações em todas as células. Aqui, o nosso objetivo foi avaliar se os metóxi-catecóis poderiam exacerbar a sua oxidação. Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que a presença de uma concentração catalítica de apocinina ou vanilina, de fato, exacerbou a oxidação de GSH, a qual é praticamente não reativa na ausência destes metóxi-catecóis. Como também pode ser observado, o ácido vanílico não demonstrou efeito pró-

oxidante significativo. Nestes experimentos, a concentração remanescente de GSH foi medida pela redução do reagente DTNB.

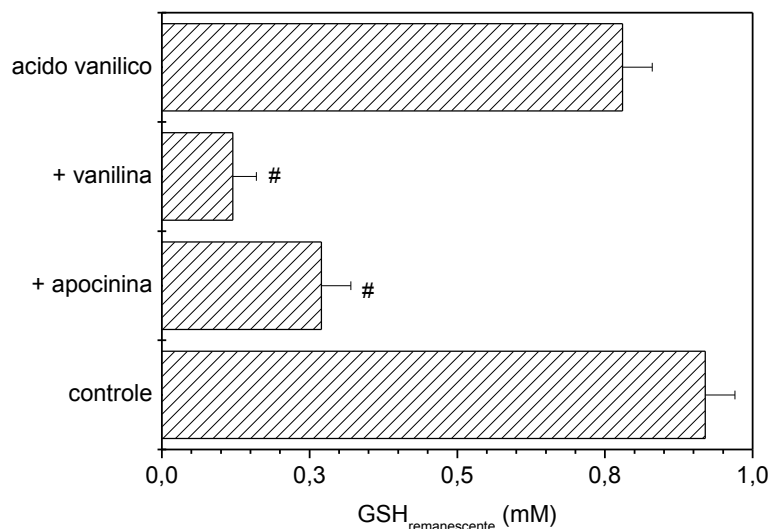


Figura 7. Oxidação de GSH mediado por radicais de metóxi-catecóis. A reação controle consistiu em uma mistura de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H_2O_2 . Apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Veja material e métodos para maiores detalhes. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicata. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle.

A oxidação de GSH leva à formação de sua forma oxidada GSSG como será discutido posteriormente. Por esta razão, a formação de GSSG foi também mensurada durante a oxidação. Como demonstrado na Figura 8, os resultados anteriores foram comprovados, pois a presença de apocinina ou vanilina promoveram a formação de GSSG.

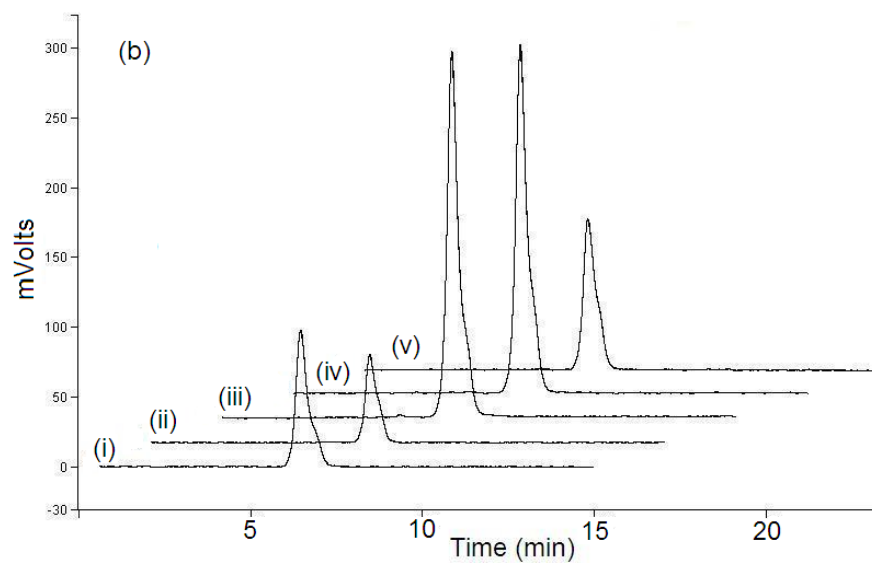


Figura 8. Produção de GSSG durante a oxidação de GSH mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação controle consistiu de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H_2O_2 . Quando presentes, apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. O produto GSSG foi derivatizado com 0.1% OPA e analisado por HPLC com detecção fluorescente. (i) padrão GSSG 0,1 mM, (ii) reação controle, (iii) reação com apocinina, (iv) reação com vanilina e (v) reação com ácido vanílico.

Outra reação química que pode ocorrer durante a oxidação radicalar de GSH é o consumo do oxigênio dissolvido no meio de reação (Pichorner et al., 1995). Assim, para reforçar os resultados acima, monitoramos o consumo de oxigênio decorrente dessas reações. Como pode ser observado na Figura 9, apenas na presença de apocinina ou vanilina observou-se o consumo de oxigênio do meio.

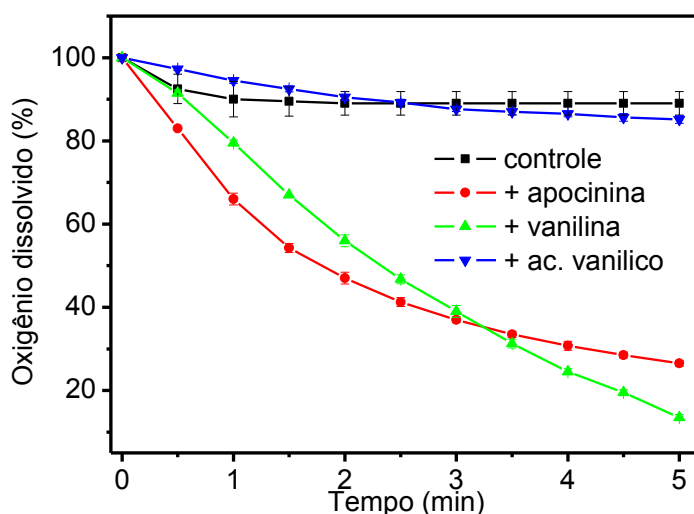


Figura 9. Consumo de oxigênio dissolvido durante oxidação de GSH mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação controle consistiu em uma mistura de 1 mM GSH, 0.1 μ M HRP, 100 μ M H₂O₂. Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Os resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas.

A capacidade co-catalítica da apocinina e vanilina frente à oxidação de grupos tióis também se estenderam àqueles presentes em proteínas (resíduos de cisteína). Nestes experimentos, a albumina de ovo foi oxidada na presença ou ausência dos metóxi-catecóis e a concentração remanescente relativa de grupos SH livres na proteína mensurada pelo reagente DTNB (Figura 10).

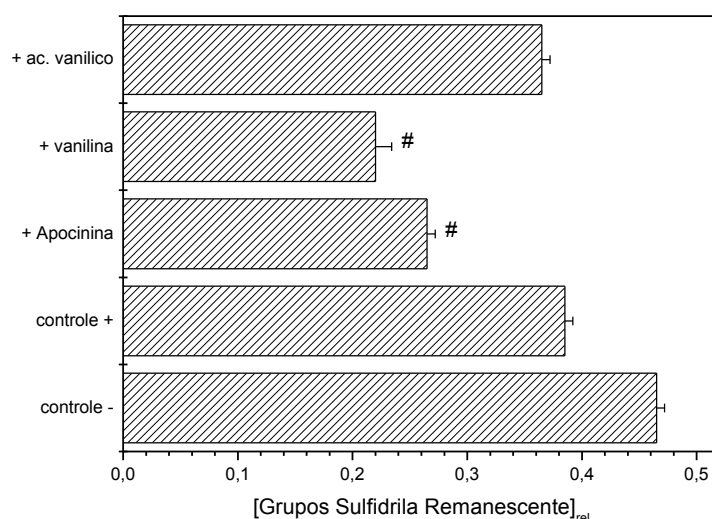


Figura 10. Oxidação de grupos sulfidrilas of (SH) em ovalbumina mediada por radicais metóxi-catecóis. A reação consistiu numa mistura (positivo controle) de 1 % (w/v) ovalbumina, 0.01 μ M HRP, 10 μ M H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Os resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle positivo. Controle negativo refere-se a concentração relativa de grupos sulfidrilas antes da oxidação.

A coenzima NADH também é susceptível à oxidação por radicais livres. Assim, considerando que a oxidação de NADH poderia ser facilmente monitorada pela queda de sua absorbância em 340 nm, avaliamos o efeito co-catalítico dos compostos em estudo sobre a oxidação dessa coenzima. A Figura 11 mostra a queda na banda de absorbância do NADH quando adicionada a apocinina no meio de reação. Como mostra a Figura 12, a adição de apocinina e vanilina provocaram um aumento significativo na velocidade de oxidação de NADH. Neste modelo experimental, o ácido vanílico também foi capaz de exacerbar a oxidação, embora o seu efeito tenha sido inferior aos apresentados pela apocinina ou vanilina.

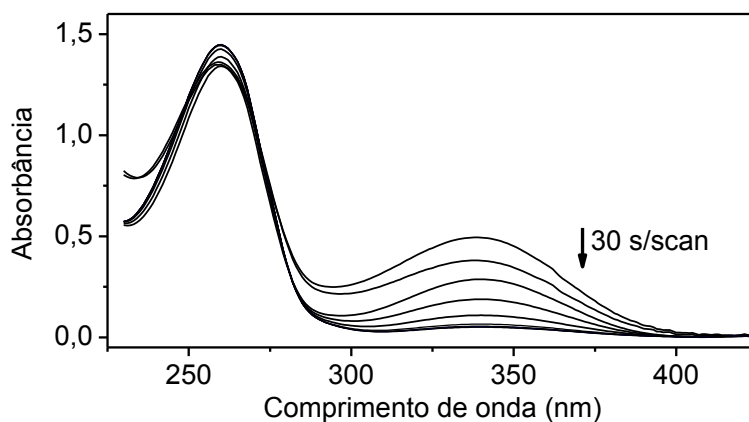


Figura 11. Alteração espectral durante a oxidação de NADPH mediada pelo radical apocinina. A reação controle consistiu em uma mistura de 100 μM NADPH, 0,01 μM HRP, 10 μM H_2O_2 . Quando presente, apocinina foi adicionado na concentração de 10 μM . Os espectros foram obtidos num intervalo de 30s.

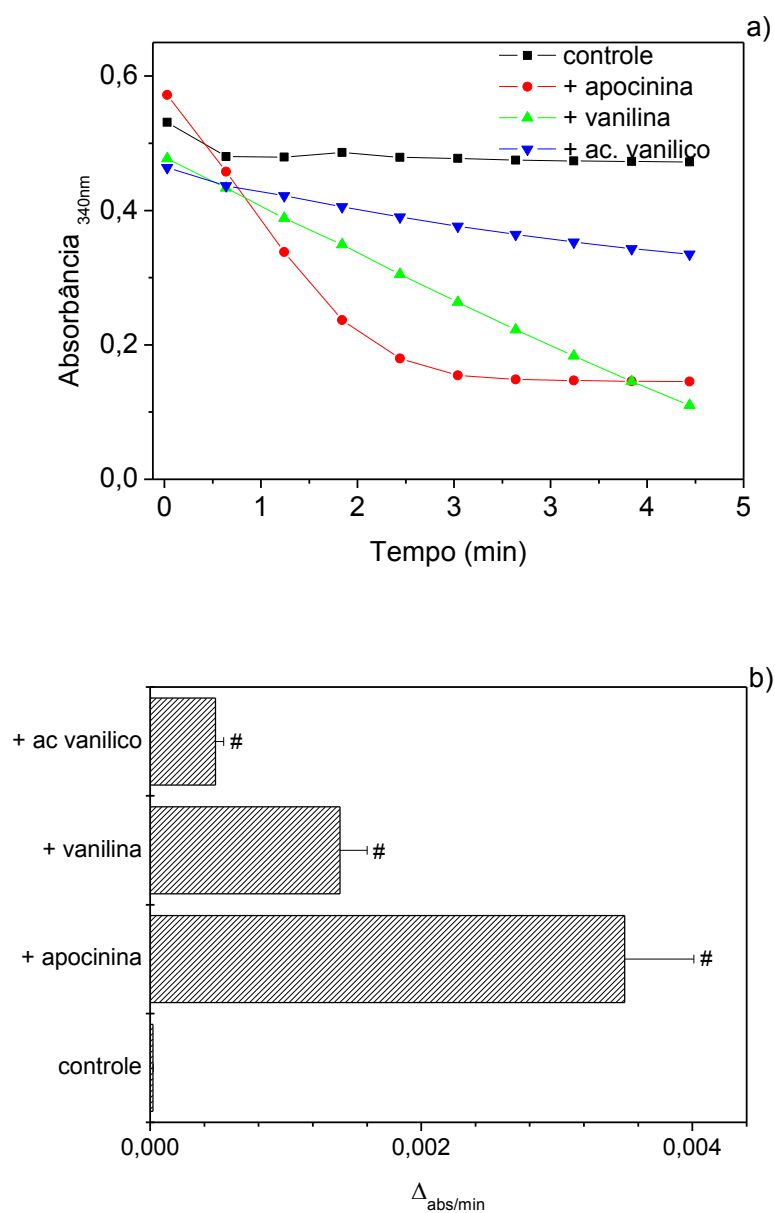


Figura 12. Oxidação de NADH mediada por radicais metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação. (B) velocidade relativa da oxidação de NADH. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μ M NADH, 0.01 μ M HRP e 10 μ M H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μ M. Os resultados são apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle.

O próximo modelo estudado foi a oxidação de estruturas quinônicas. O próprio antioxidante trolox possui esta estrutura e também é susceptível a oxidação por radicais livres. Sua oxidação pode ser monitorada pelo decaimento na absorbância em 272 nm (Figura 13). Novamente ficou claro que a presença de apocinina ou vanilina exacerbava a oxidação (Figura 14).

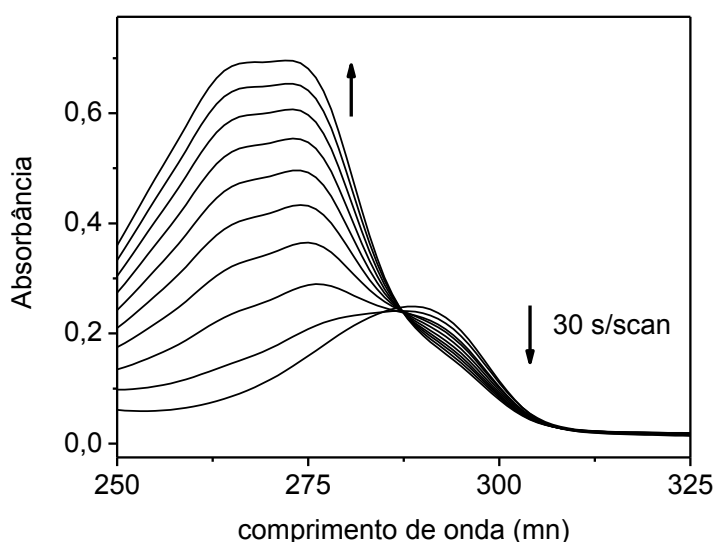


Figura 13. Oxidação do trolox mediada pelo radical apocinina. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM trolox, 0.01 μM HRP e 10 μM H_2O_2 . Quando presente, apocinina foi adicionados na concentração de 5 μM . Escaneamentos foram obtidos em intervalos de 30s.

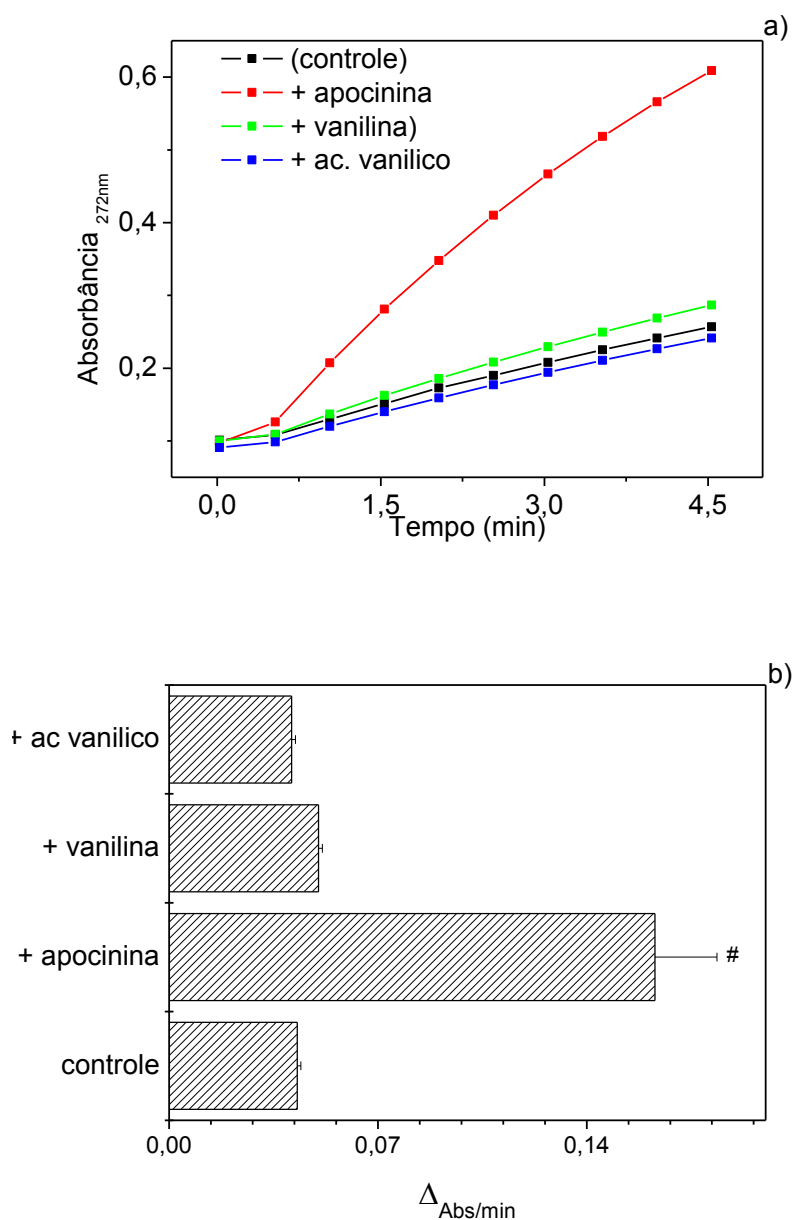


Figura 14. Oxidação de trolox mediado por radicais metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação (B) Velocidade relativa da oxidação do trolox . A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM trolox, 0,01 μM HRP e 10 μM H_2O_2 . Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 10 μM . Resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. Os resultados estão apresentados como média e SD de triplicatas. # $p < 0,05$, teste T de Student em relação ao controle.

No mesmo contexto, utilizamos o fármaco rifampicina, uma molécula com um grupo hidroquinona cuja oxidação pode ser visualizada pelo decaimento de absorbância em 470 nm. Novamente o efeito pró-oxidante foi verificado para a apocinina e vanilina (Figuras 15).

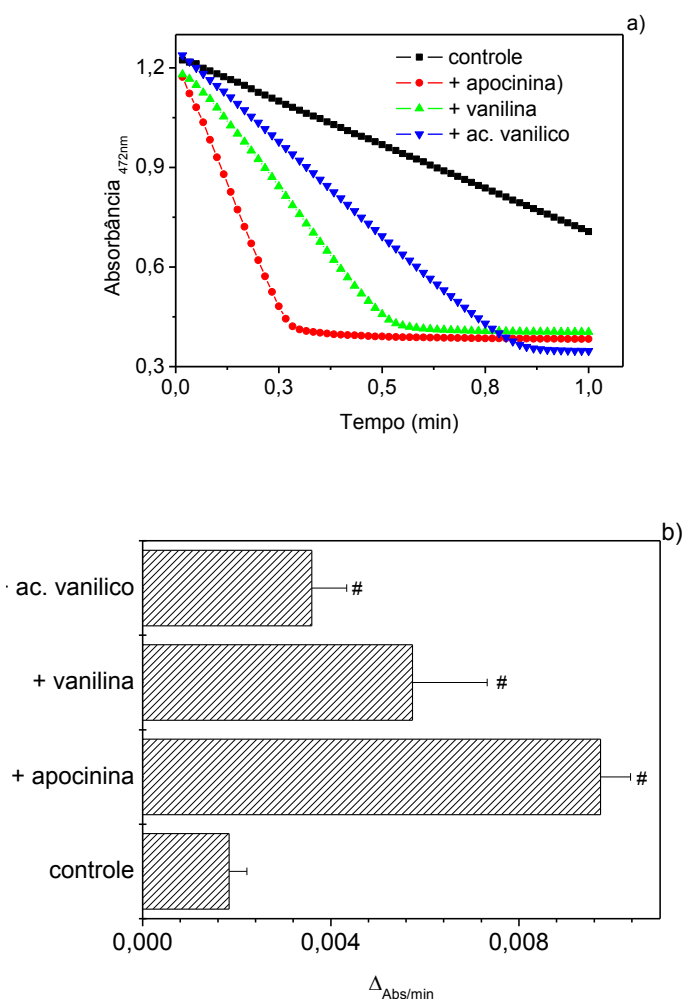


Figura 15. Oxidação da rifampicina mediada por metóxi-catecóis. (A) Perfil cinético de oxidação da rifampicina. (B) Velocidade relativa da oxidação da rifampicina. A reação controle consistiu numa mistura de 100 μM rifampicina, 0.01 μM HRP, and 50 μM H_2O_2 in 0.1 M tampão fosfato pH 5.4. Quando presente apocinina, vanilina e ácido vanílico foram adicionados na concentração de 50 μM . Os resultados estão apresentados como média e SD de experimentos em triplicata. # $p < 0.05$, teste T de Student em relação ao controle.

5- Discussão (*Características Antioxidantes e Pró-oxidantes*)

Embora existam controvérsias sobre a eficiência e seletividade, a apocinina continua sendo a mais utilizada substância inibidora do complexo NADPH oxidase em diversos modelos experimentais e utilizando diferentes linhagens celulares (Stolk *et al.*, 1994; Lafeber *et al.*, 1999; Hougee *et al.*, 2006). Contudo, há também crescentes evidências de que a mesma apresenta propriedades pró-oxidantes no meio intracelular e que esta característica possa estar relacionada ao seu mecanismo de ação e/ou efeitos tóxicos (Riganti *et al.*, 2006 e Vejraska *et al.*, 2005). Por estes motivos, esta primeira parte do trabalho foi voltado ao esclarecimento das características antioxidantes e pró-oxidantes da apocinina e dos compostos correlatos vanilina e ácido vanílico. Para isso, nossa premissa básica foi baseada no fato de que a apocinina é considerada uma pró-droga, a qual deve ser ativada por oxidação para exercer seu efeito como inibidora do complexo NADPH oxidase (Simons *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 2002; Barbieri *et al.*, 2004). Adicionalmente, a oxidação de compostos fenólicos tem sempre como intermediários radicais fenóxidos, como é o caso da própria apocinina. Então seria possível que este radical de apocinina pudesse exercer características pró-oxidantes. Vale lembrar que trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado esta característica para a apocinina por meio de sua interação com GSH (Ximenes *et al.*, 2008). Portanto, o que buscávamos aqui era verificar se este efeito pró-oxidante poderia se expressar frente a outras biomoléculas, e como discutiremos a seguir, comparar a apocinina com as moléculas correlatas vanilina e ácido vanílico.

O termo “atividade pró-oxidante” é genérico e indica a propriedade de uma determinada substância, uma enzima, uma proteína, etc., em iniciar ou exacerbar um

processo oxidativo. Vários estudos demonstram a atividade pró-oxidante de várias substâncias, como exemplos pode-se citar a *Camellia Sinensis* (Lambert *et al.*, 2010), melatonina (Bejarano *et al.*, 2010), curcumina (Suphim *et al.*; 2010) entre outras. Muitas vezes, esta atividade pró-oxidante se correlaciona com suas propriedades como indutoras de apoptose e necrose em diversas linhagens de células tumorais. Além disso, não é incomum que clássicas substâncias antioxidantes possuam também características pró-oxidantes (Robaszkiewicz *et al.*, 2007; Sandur *et al.*, 2007; Bhat *et al.*, 2006). Para compostos fenólicos em geral, uma via pró-oxidante importante está baseada na capacidade dos radicais livres dos mesmos, gerados com intermediários durante as suas oxidações, serem capazes de propagar outra reação de oxidação. Por exemplo, um estudo recente demonstrou que substâncias fenólicas com potencial de oxidação menor do que 0.45 V atuam como antioxidantes, enquanto compostos com valores acima de 0.45V podem apresentar efeitos pró-oxidante (Simic' *et al.*, 2007).

Neste contexto, nossos resultados indicam claramente que o radical de apocinina é um autêntico exemplo de um composto fenólico cujas propriedades pró-oxidantes são exacerbadas. Resultados similares foram obtidos para a vanilina, mas não para o ácido vanílico. Como mencionado anteriormente, a diferença entre estes compostos reside na substituição na posição *para* no anel aromático. Os grupos acetila e formila presentes na apocinina e vanilina, respectivamente, são grupos classificados como retiradores de elétrons. Por outro lado, o grupo carboxilato, presente no ácido vanílico, é doadores de elétrons (Vollhardt & Schore, 2004). Em geral, grupos retiradores de elétrons aumentam o potencial de redução e grupos doadores de elétrons diminuem o potencial de redução. Assim, se o potencial de redução destes compostos fenólicos determina se os mesmos possuirão características antioxidantes ou pró-oxidantes como mencionado anteriormente

(Semic' *et al.*, 2007), então seria esperado que a apocinina e a vanilina pudessem apresentar características pró-oxidante mais exacerbadas do que o ácido vanílico, como de fato se verificou. Por outro lado, coerente com esta proposta, o ácido vanílico se apresentou como melhor antioxidante do que a apocinina e vanilina. No entanto, não podemos esquecer que mesmo o ácido vanílico é relativamente pouco eficiente como antioxidante, o que foi verificado por meio de sua comparação com o trolox.

Chamou à atenção a capacidade dos radicais da apocinina e da vanilina em oxidar tióis como GSH, cisteína e resíduos de cisteína em ovalbumina. Como exemplo desta característica pode-se citar nosso resultado que mostrou que a adição de 10 μM de apocinina no meio de reação foi capaz de promover a oxidação de 650 μM de GSH, enquanto em sua ausência, somente cerca de 90 μM GSH foi oxidado pelo sistema HRP/H₂O₂. O tripeptídeo GSH é o maior antioxidante endógeno em células de mamíferos e a razão GSH/GSSG é um reflexo direto do status redox celular (Jones *et al.*, 2006). Assim, os resultados aqui apresentados sugerem que se radicais de apocinina forem gerados no meio intracelular, os mesmos levarão à depleção de GSH e à conseqüente alteração no status redox celular, como previamente descrito (Ximenes *et al.*, 2007., Schlüter *et al.*, 2008; Heumüller *et al.*, 2008; Mora-Pale *et al.*, 2009;). Adicionalmente, a oxidação de tióis pode iniciar um ciclo redox que culmina com a produção do radical ânion superóxido, amplificando os efeitos pró-oxidantes (Pichoner *et al.*, 1995). Da mesma maneira, os radicais de apocinina e vanilina foram capazes de oxidar estruturas quinônicas modelos como o trolox e a rifampicina. Isto sugere que o mesmo poderia ocorrer com estruturas quinônicas intracelulares como o carreador de elétrons na cadeia de transporte de elétrons a coenzima Q (CoQ) e dessa maneira propagando o seu efeito pró-oxidante.

Além de tióis e estruturas quinônicas, os radicais de apocinina e vanilina foram capazes de exacerbar a oxidação da coenzima NADPH. Este efeito pode ter duas conseqüências. Em primeiro lugar, a coenzima NADPH é o co-substrato do complexo enzimático NADPH oxidase. Assim, a sua oxidação pelos radicais de apocinina poderia contribuir para o efeito inibitório que a mesma exerce sobre este complexo. Em segundo lugar, a oxidação de NADPH também poderia contribuir para o desbalanço redox das células, pois além de depletar uma coenzima redutora essencial à manutenção do status redox, a própria oxidação de NADPH envolve o intermediário $\text{NADP}^\bullet$ (NADP radical) que também poderia iniciar um processo pró-oxidante pela redução do oxigênio molecular para ânion superóxido (Galati., 2002).

Um ponto que deve ser enfatizado, neste trabalho, é que a atividade pró-oxidante da apocinina e da vanilina, aqui caracterizadas, está relacionada às suas oxidações prévias, em outras palavras, são os radicais gerados durante a sua oxidação é que são pró-oxidantes e não as moléculas de apocinina e vanilina em suas formas reduzidas. Por outro lado, considerando que a apocinina passa por um processo de oxidação para exercer seus efeitos (Johnson *et al.*, 2002), pode-se supor que os seus radicais livres poderão ser formados quando a mesma é utilizada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Assim, a nossa proposta é de que esta característica pró-oxidante possa estar envolvida nos efeitos biológicos da apocinina.

Além disso, há uma clara correlação entre a alteração do status redox celular e a conseqüente ativação de fatores de transcrição como o NFkappaB (Blásques et al., 1997). Assim, a incubação de células com apocinina poderia ter como conseqüência a ativação de genes ligados à produção e/ou inibição de citocinas pró-inflamatórias, proliferação celular, apoptose, etc, características que de fato têm sido demonstradas para a apocinina (Riganti *et*

al., 2008; Ceravolo *et al.*, 2007; Paterniti *et al.*, 2010). Deve-se ressaltar que estes efeitos não estão necessariamente ligados à inibição do complexo NADPH oxidase, o que expande as possibilidades de aplicações da apocinina. De fato, esta característica foi a base para os nossos estudos de aplicação da apocinina e seus correlatos em modelos de inflamação e dor e que serão discutidos na próxima seção deste trabalho. No esquema abaixo apresentamos nossas propostas para os possíveis efeitos pró-oxidantes da apocinina (Figura 16).

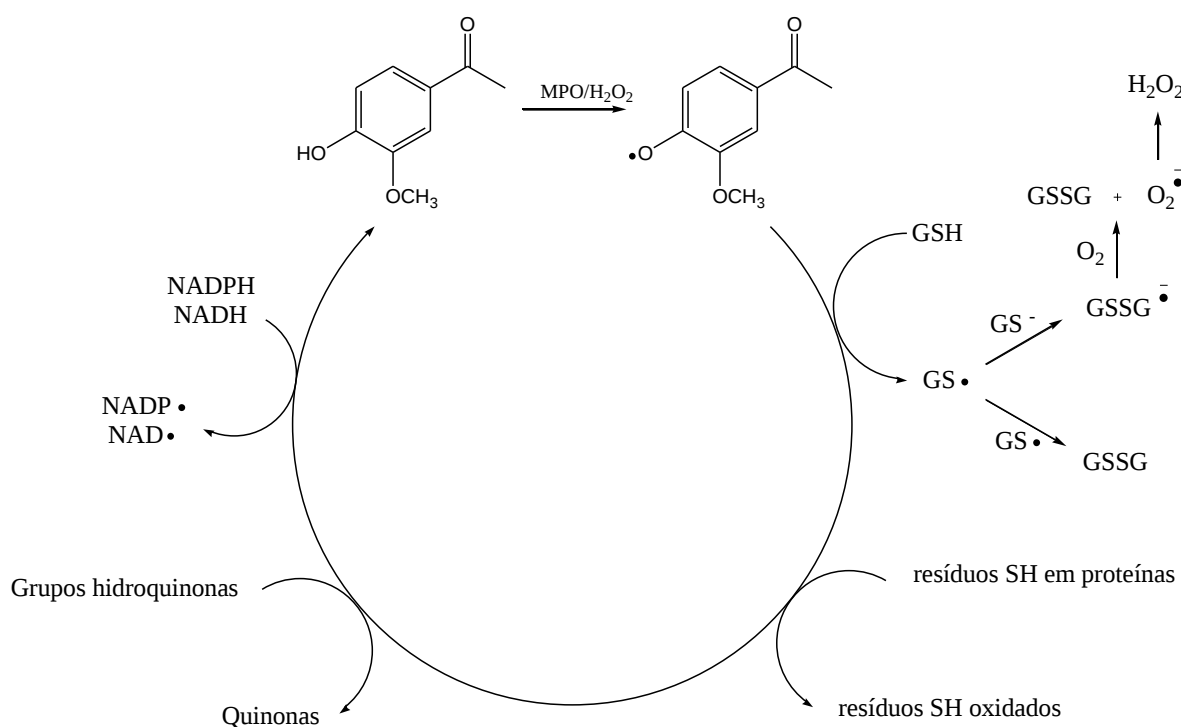


Figura 16. Caracterização da apocinina como molécula com características pró-oxidantes.

6- Resultados (Estudos Farmacológicos)

6.1 Edema de pata

Nas figuras 17, 18, 19 e 20, estão expressos os resultados da ação antiedematogênica dos compostos estudados (100 mg/Kg v.o.) Os valores indicam a diferença entre a média do controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg) e a média dos grupos tratados.

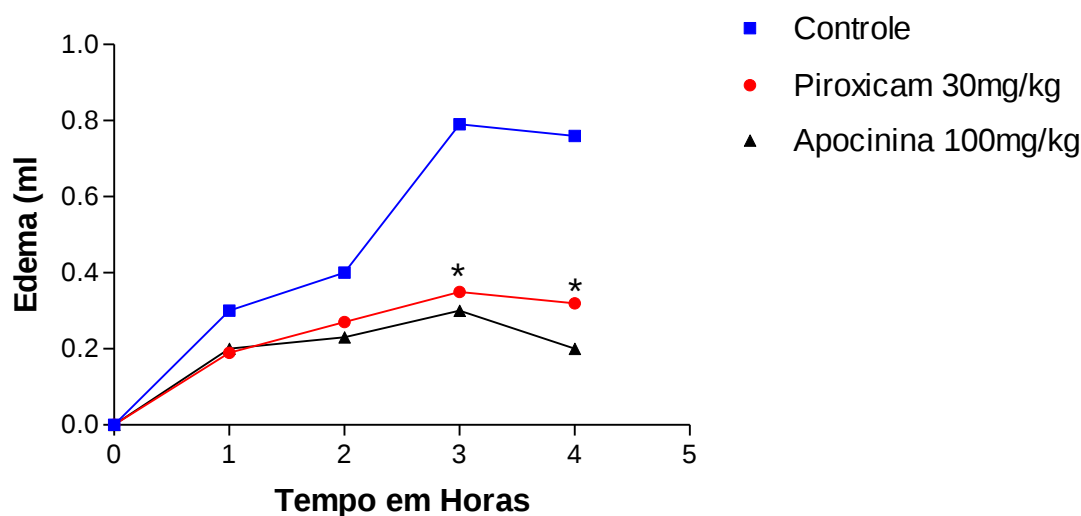


Figura 17. Efeito antiedematogênico da apocinina (100mg/kg, v.o) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Test de Dunnet, os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

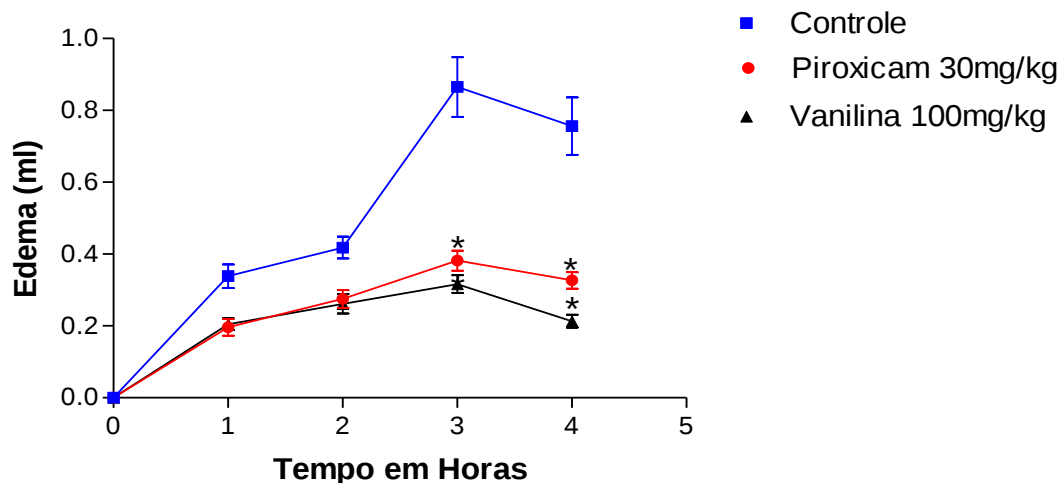


Figura 18. Efeito antiedematogênico da vanilina (100mg/kg, v.o) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Teste de Dunnet os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

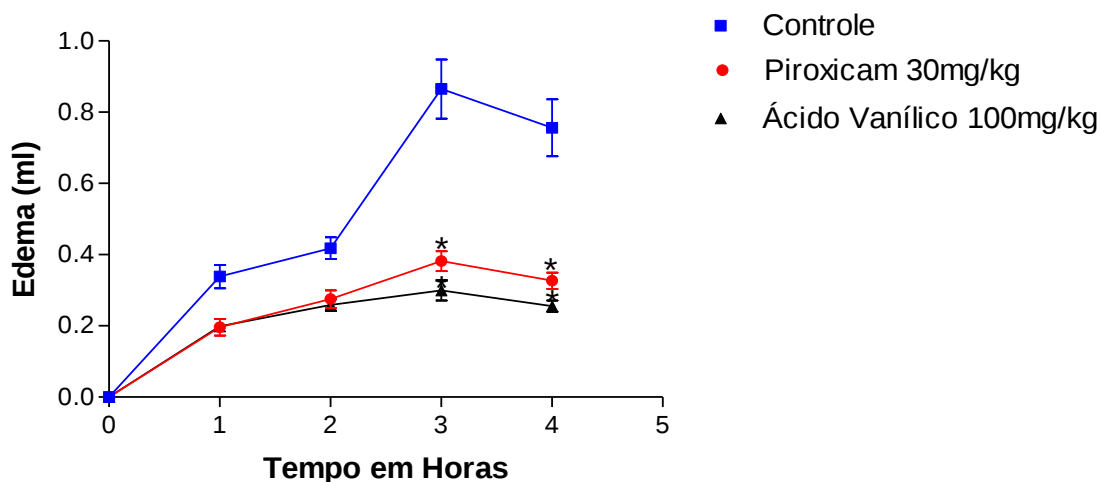


Figura 19. Efeito antiedematogênico do ácido vanílico (100mg/kg, v.o) no modelo de indução de edema de pata, por carragenina. Teste de Dunnet os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média do grupo tratado. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

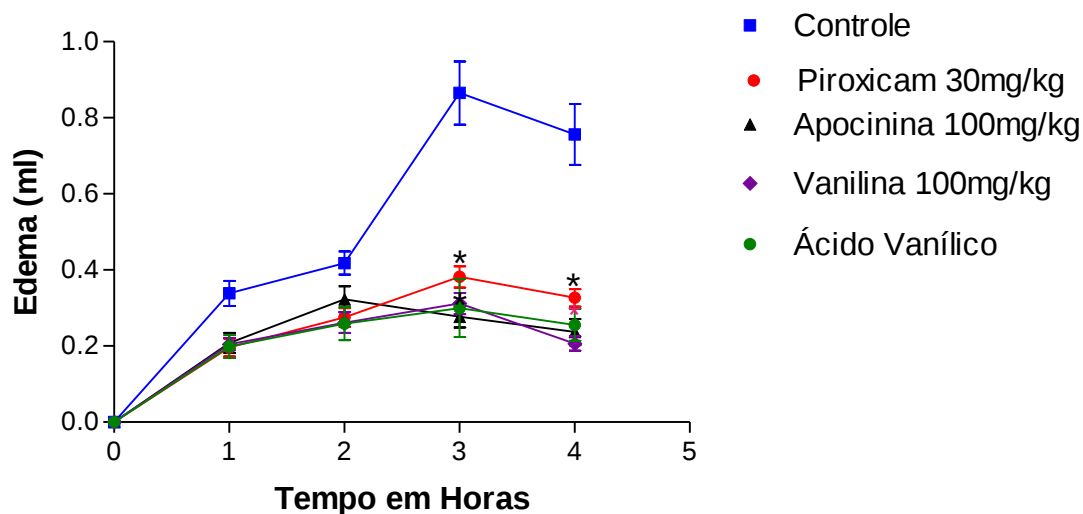


Figura 20. Efeito antiedematogênico da apocinina, vanilina e do ácido vanílico (100mg/kg, v.o) no modelo de indução de edema de pata por carragenina. Tste de Dunnet Os valores expressam a diferença do volume da pata entre a média do grupo controle negativo (salina), controle positivo (piroxicam 30mg/Kg e a média dos grupos tratados. Os resultados são apresentados como médias (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significante em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.2 Teste das contorções

Os resultados da Figura 21, demonstram que a administração da apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de 100 mg/kg, v.o, inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%.

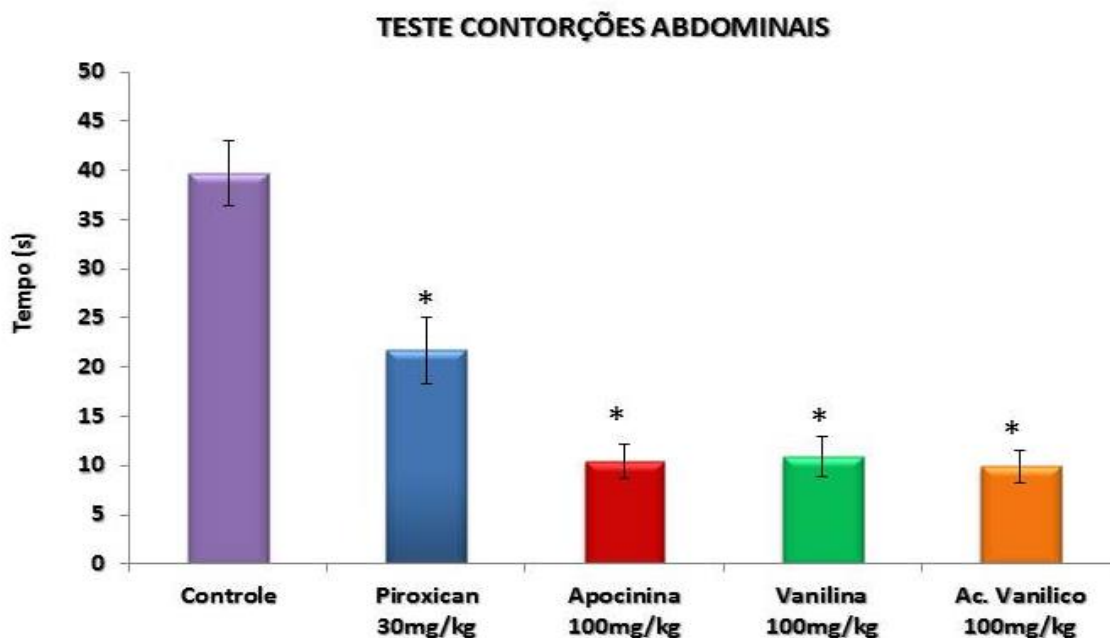


Figura 21. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina, ácido vanílico todos na dose de (100 mg/kg, v.o), no teste das contorções (tempo de latência em segundos). Teste de Dunnet as barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.3 Testes da placa quente e da retirada da cauda (Tail-Flick)

Os resultados da Figura 22 e da Figura 23 demonstram que a apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de 100 mg/kg, v.o, não alteraram o período de latência tanto no teste da placa quente quanto no teste de retirada da cauda. No entanto, o tratamento com morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 5 mg/kg, s.c.) aumentou o período de latência de resposta dos animais nos dois testes avaliados.

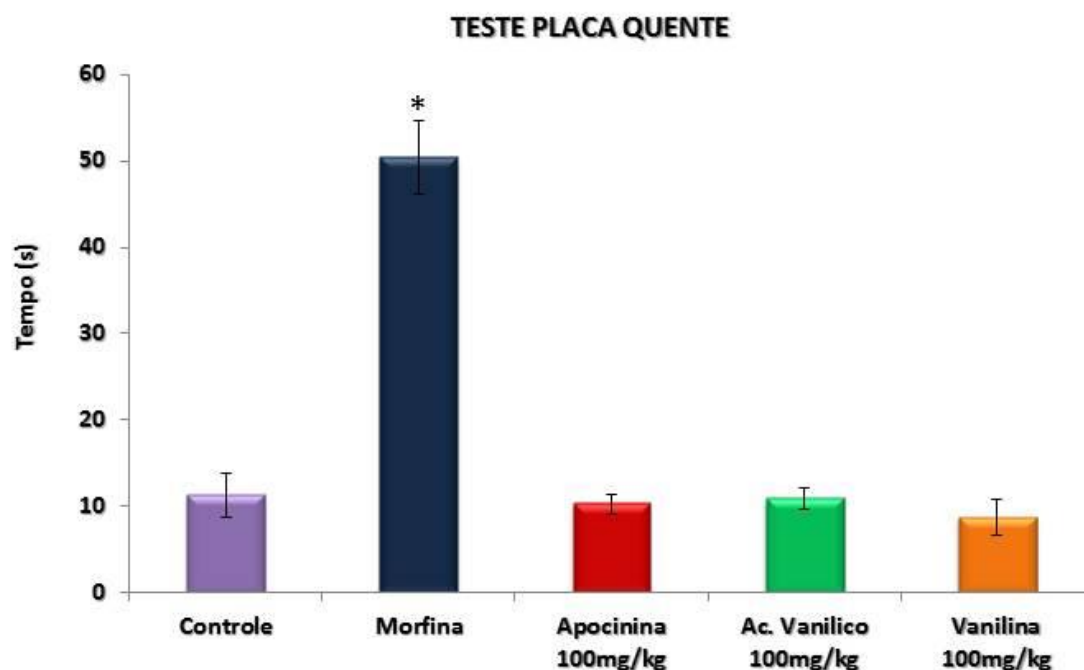


Figura 22. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de (100 mg/kg, v.o), no teste da placa quente (tempo de latência em segundos). Teste de Dunnett as barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$).

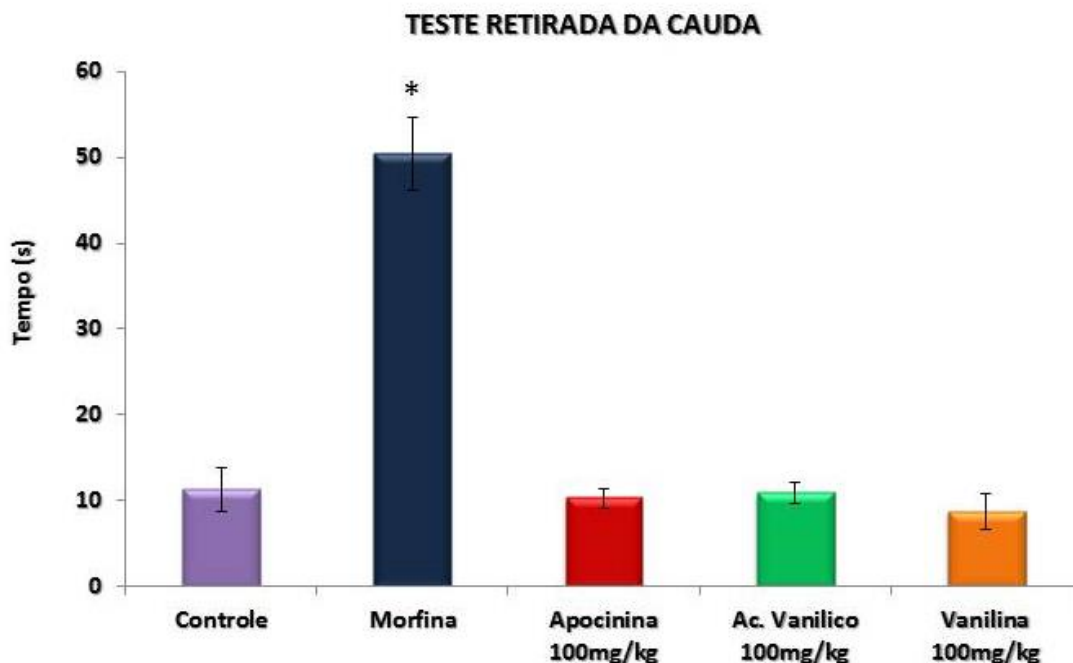


Figura 23. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico, todos na dose de (100 mg/Kg, v.o), no teste da placa quente (tempo de latência em segundos). Teste de Dunnet as barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$).

6.4 Teste da formalina

O teste da formalina consiste em duas fases distintas de nocicepção. A primeira fase (neurogênica) inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 min, enquanto a segunda fase, inflamatória, ocorre entre 15-30 min.

A administração de apocinina, vanilina e ácido vanílico administrados via v.o., na dose de 100 mg/kg, não inibiram a fase neurogênica (Figura 24), mas inibiram significativamente a segunda fase, ou seja, a fase inflamatória da nocicepção induzida pela formalina (Figura 25).

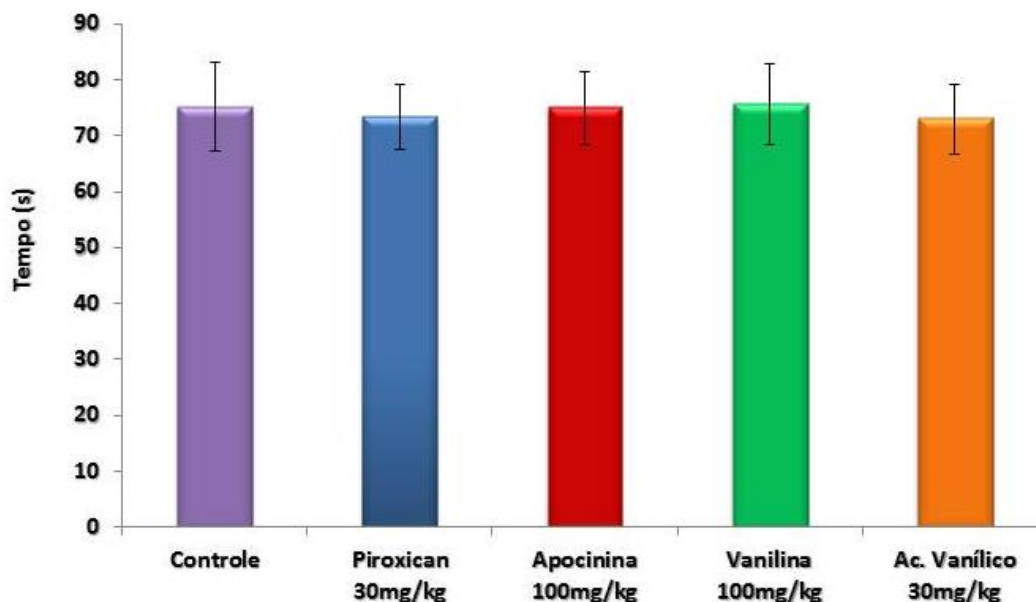


Figura 24. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico (100mg/Kg, v.o) no teste da formalina (fase neurogênica). As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

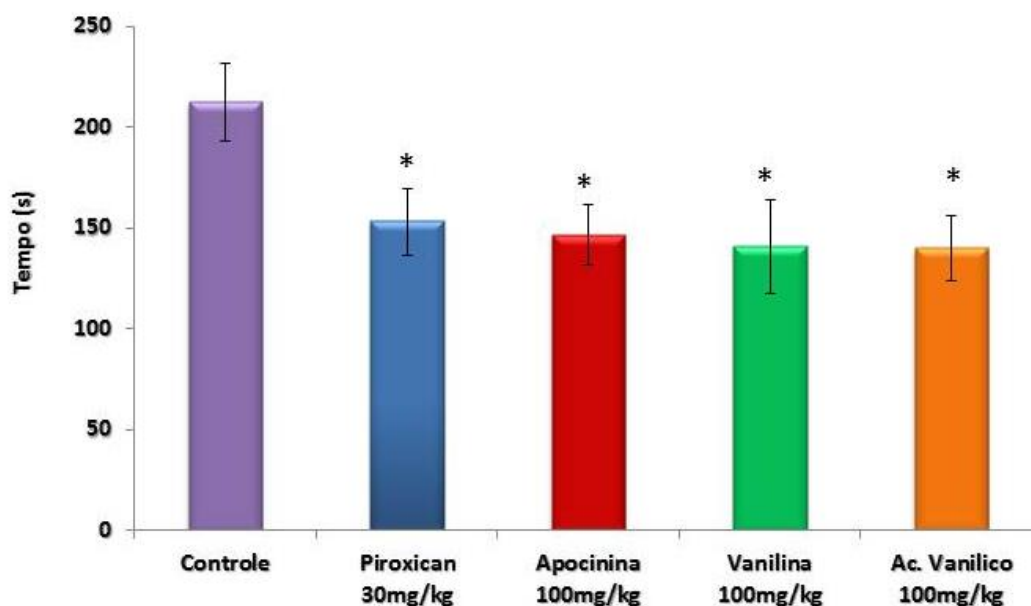


Figura 25. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina, vanilina e ácido vanílico (100mg/Kg, v.o) no teste da formalina (fase inflamatória). Teste de Dunnett as barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

6.5 Hiperálgia mecânica induzida por carragenina

A hiperálgia foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 μ l) na pata posterior direita e as medidas da sensibilidade dolorosa foram avaliadas nos seguintes tempos: 1h, 2h, 3h e 4h. Nossos resultados demonstram que os compostos estudados foram capazes de diminuir a hiperálgia em relação ao controle, principalmente na terceira hora

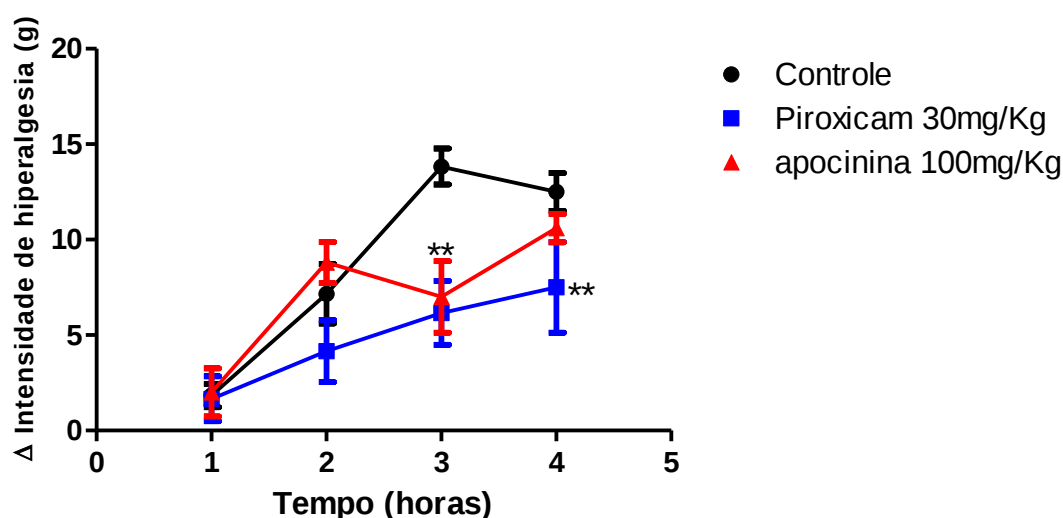


Figura 26. Avaliação antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) na hiperálgia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperálgia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

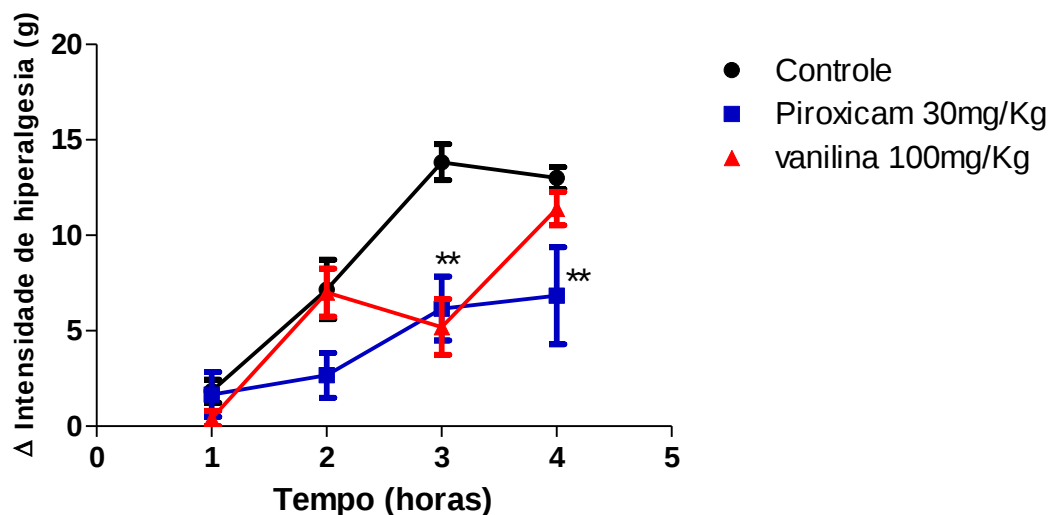


Figura 27. Avaliação antinociceptiva da vanilina (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

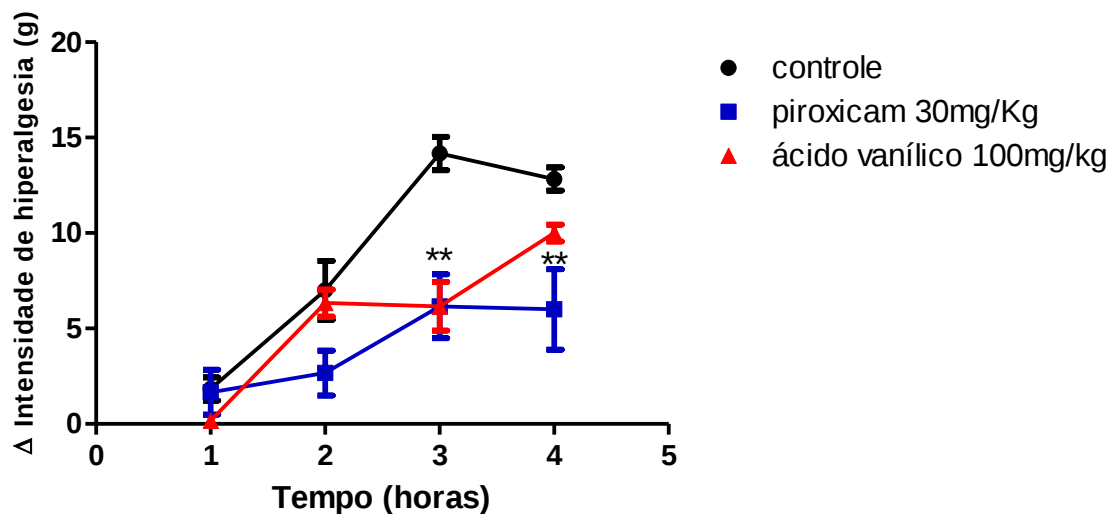


Figura 28. Avaliação antinociceptiva do ácido vanílico (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

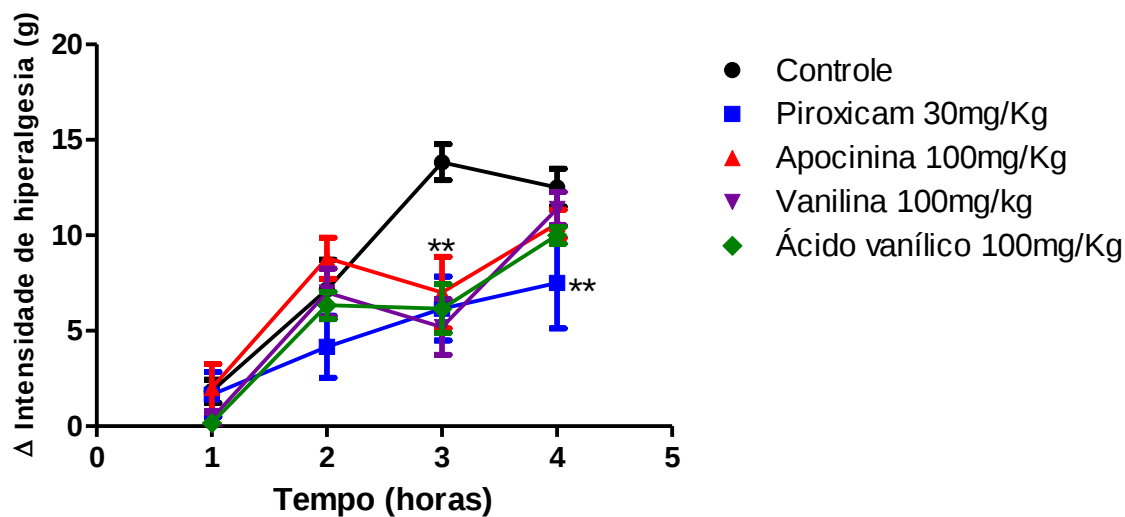


Figura 29. Avaliação antinociceptiva da apocinina, vanilina e do ácido vanílico, todos na dose de (100 mg/kg, v.o) na hiperalgesia mecânica. Os valores expressam a diferença da hiperalgesia entre a média do grupo controle positivo (salina) e a média do grupo tratado. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão desvio padrão da média (n = 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.6 Estudo dos possíveis mecanismos de ação da apocinina

6.6.1 Avaliação da participação de óxido nítrico (NO)

Deste ponto em diante e em virtude dos resultados semelhantes obtidos para as três substâncias utilizadas, da maior relevância para os achados para apocinina e pela escassez de tempo para conclusão do projeto, resolvemos centralizar nossos esforços especificamente na apocinina.

Para investigar o possível papel do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação antinociceptiva deste composto, foi utilizado a *L*-arginina, substrato para síntese de NO, e também o *L*-NAME, inibidor da NO sintase, a fim de verificar possível reversão da ação antinociceptiva da apocinina. O *L*-NAME foi utilizado como um pré-tratamento na dose de 65 mg/Kg antes da administração oral da apocinina (100 mg/Kg). Os resultados apresentados (Figura 30) mostram que na fase inflamatória, observou-se uma ação antinociceptiva do *L*-NAME, enquanto que o efeito antinociceptivo da apocinina, quando administrada posteriormente ao tratamento com *L*-NAME, não provocou alteração se comparado ao resultado na ausência de *L*-NAME.

Ainda na Figura 30 estão demonstrados os ensaios utilizando *L*-arginina (substrato para síntese de NO). Sendo assim, foi realizado um pré-tratamento dos animais, com *L*-arginina, na dose de 500 mg/kg (via i.p) 30 minutos antes da administração oral da apocinina (100 mg/kg). Os resultados mostram que *L*-arginina reverte o efeito antinociceptivo do *L*-NAME, mas não reverteu o efeito antinociceptivo da apocinina. Na fase neurogênica do teste da formalina, não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados acima (não mostrado).

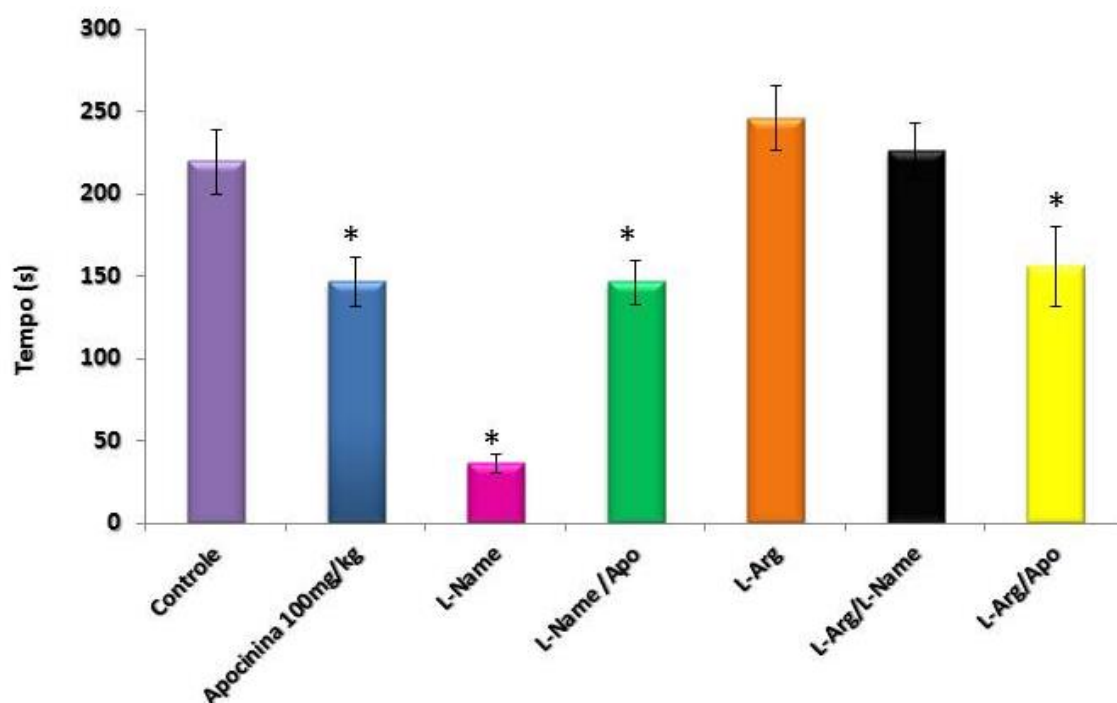


Figura 30. Avaliação da participação do óxido nítrico na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) no teste da formalina. As barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.6.2 Avaliação da possível participação do via serotoninérgica

Para o estudo da via serotoninérgica, foi realizado um pré-tratamento durante quatro dias com o PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase), interferindo assim, na síntese e quantidade de serotonina liberada pelo neurônio pré-sináptico. Na fase neurogênica não houve diferença estatística entre os grupos (não mostrado). Por outro lado, na fase inflamatória observamos que o pré-tratamento o PCPA na dose de 45 mg/kg, i.p reverteu completamente o efeito antinociceptivo da apocinina.

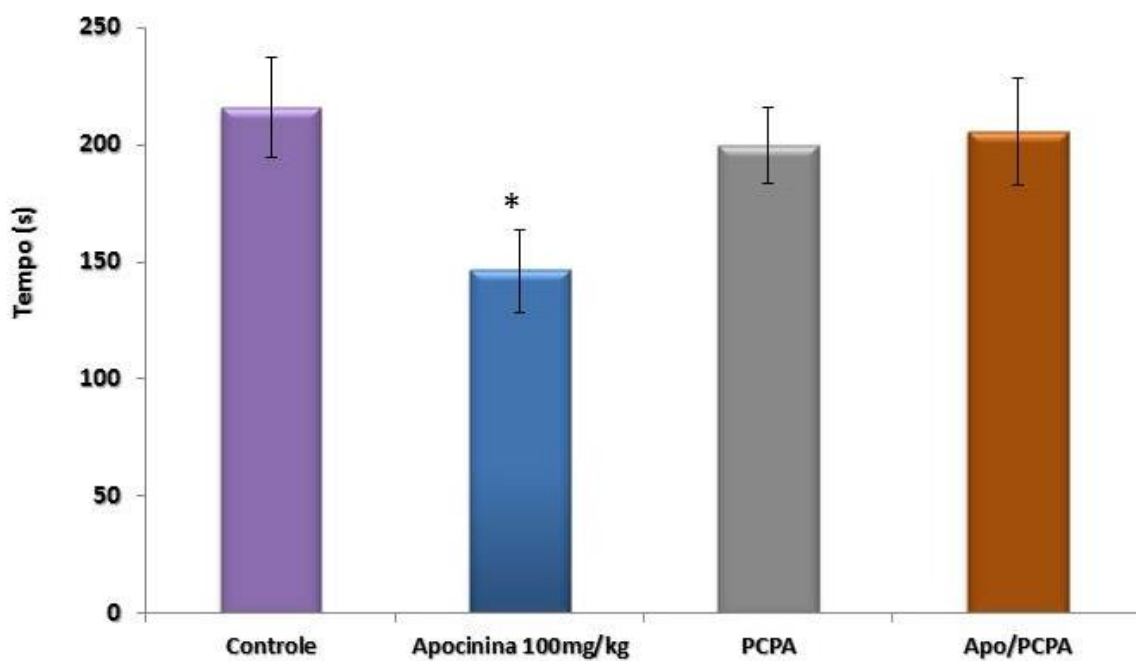


Figura 31. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o), no teste da formalina. Teste de Dunnet as barras representam os valores de média $\pm$ erro padrão da média (n= 6-8). respectivos grupos controles. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6.6.3 Avaliação da possível participação dos receptores 5HT-₁ e 5HT-₃ na atividade antinociceptiva da apocinina

Afim de aprofundarmos nosso estudo, sobre o sistema serotoninérgico, fomos avaliar a participação dos receptores 5HT-₁ e 5HT-₃, através do teste da formalina utilizando antagonistas seletivos para estes receptores sendo o WAY 100635 para o receptor 5HT-₁ e o onadasetron para o receptor 5HT-₃. Nossos resultados (Figura 32 e 33) demonstraram que tanto na fase neurogênica (não mostrado), como na fase inflamatória não houve diferença estatística entre os grupos. Pois o pré-tratamento com ambos antagonistas, não foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo da apocinina.

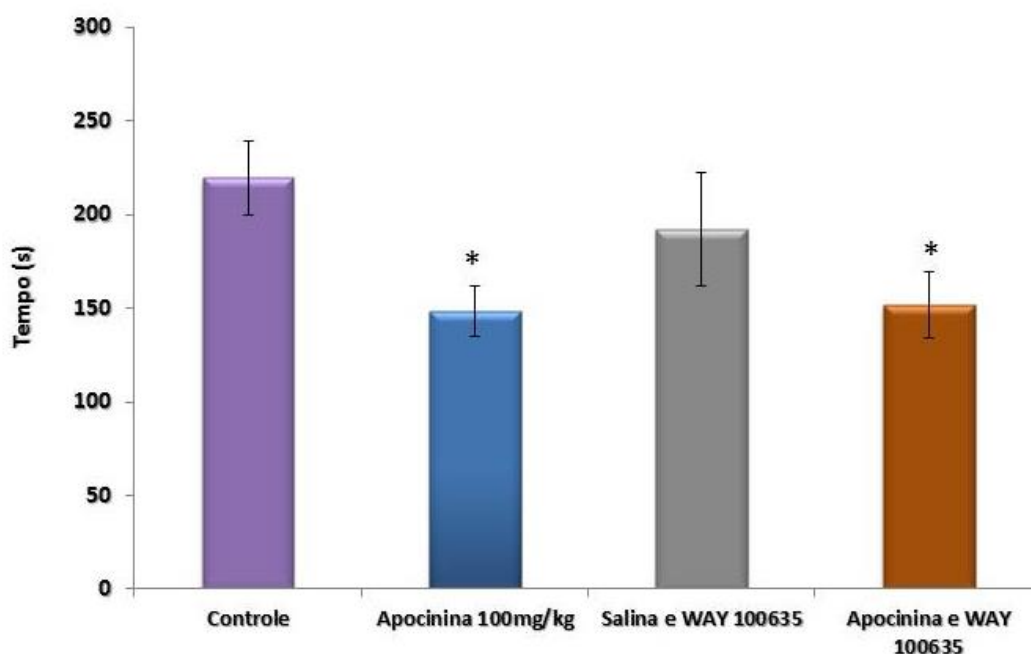


Figura 32. Avaliação da participação do receptor 5H-₁ na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/kg, v.o) no teste da formalina. Teste de Dunnet as barras representam os valores de média ± erro padrão da média (n= 6-8). Ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

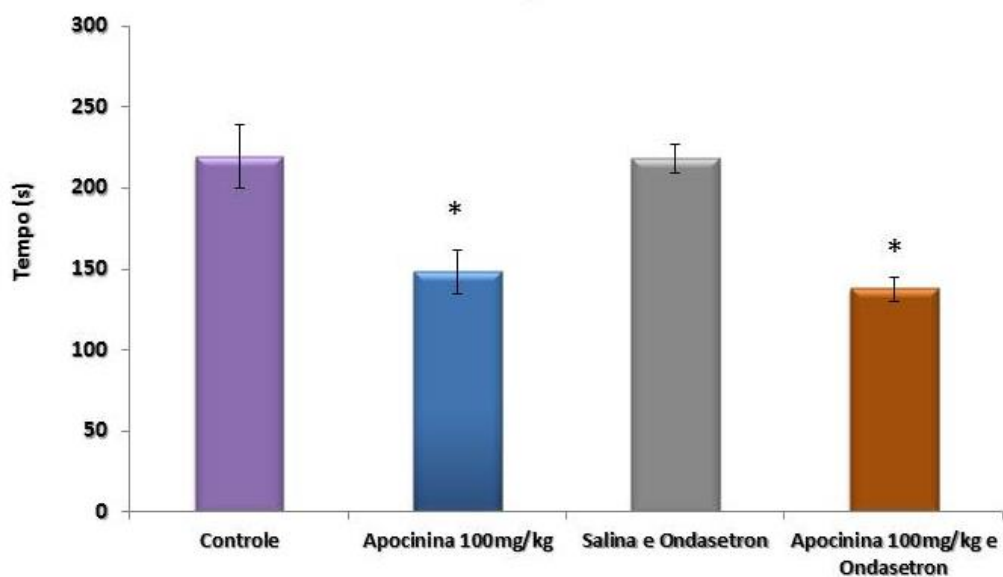


Figura 33. Avaliação da participação do receptor 5HT₃ na atividade antinociceptiva da apocinina (100 mg/Kg, v.o) no teste da formalina. Teste de Dunnet as barras representam os valores de média ± padrão da média (n= 6-8). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

6.6.4 Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

Com o objetivo de avaliar se na antinocicepção promovida pela apocinina há o envolvimento dos receptores TRPV1, utilizamos a capsaicina que é uma agonista deste tipo de receptor. Foi injetado (20µL, i.p.l) de capsaicina (1,6µ/pata).

A figura 34 mostra que a administração via oral da apocinina (100 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida por capsaicina.

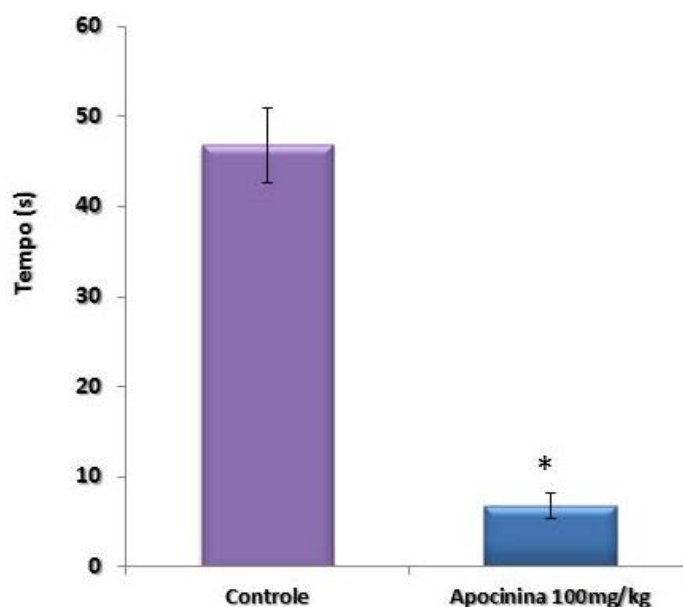


Figura 34. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Teste T de Student ($p < 0,01$). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle

6.6.5. Efeito da apocicininina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

Com o objetivo de avaliar se na antinocicepção promovida pela apocinina há o envolvimento dos receptores TRPA1, utilizamos o cinamaldeído que é uma agonista deste tipo de receptor. Foi injetado (20 μ L, i.p.l) de cinamaldeído(10 nmol/pata).

A figura 35 mostra que a administração via oral da apocinina (100 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida por cinamaldeído.

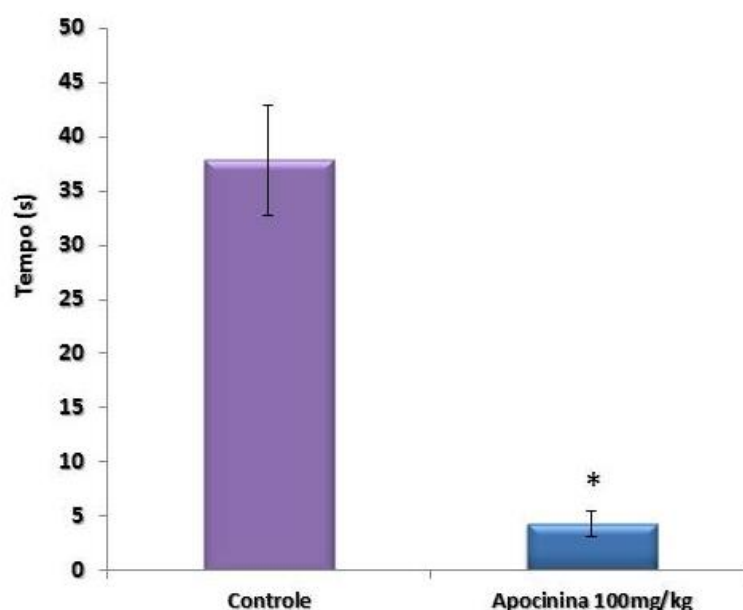


Figura 35. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocininina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Teste T de Student ($p < 0,01$). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle

6.6.6. Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol

Para avaliar, se no efeito antinociceptivo da apocinina existe o envolvimento dos receptores TRPM8, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção de (20 μ L) de mentol (agonista TRM8).

A administração via oral da apocinina (100 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida por mentol (10 nmol/pata)

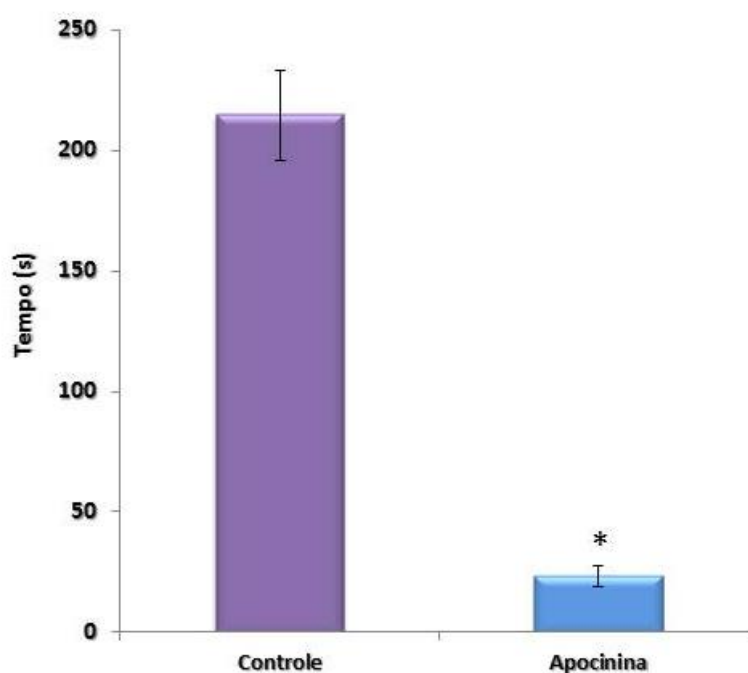


Figura 36. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol. Teste T de Student ($p < 0,01$). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle

6.6.7. Efeito da apocinina na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

Para avaliar, se no efeito antinociceptivo da apocinina existe o envolvimento do sistema glutamatérgico), foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (20µL) de glutamato (20µmol).

A administração via oral da apocinina (100 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida por glutamato.

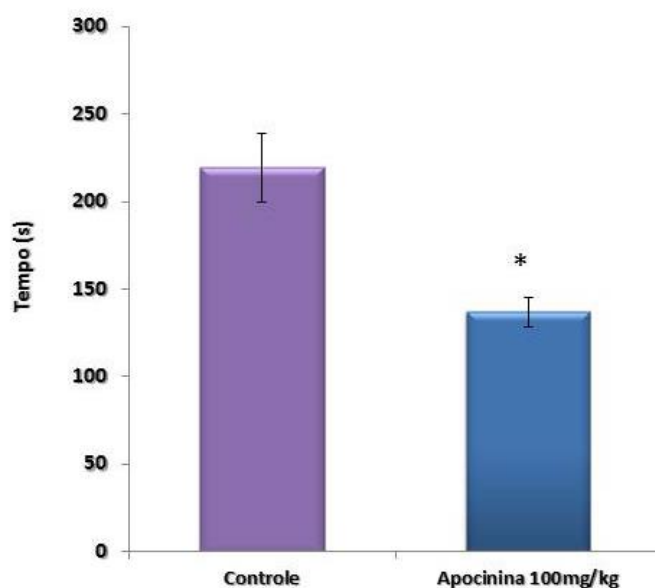


Figura 37. Avaliação do efeito antinociceptivo da apocinina (100 mg/kg, v.o) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Teste T de Student ($p < 0,01$). As barras representam os valores da média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6-8$). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle

7- Discussão (Efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos)

A dor está frequentemente associada a muitas doenças. Apesar dos principais avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na dor e investimento considerável na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento nessa área, ainda existem poucas classes de drogas analgésicas (Phero *et al*, 2004). Além disso, as terapias atuais são usualmente insuficientes por possuírem efeitos colaterais severos e de efetividade limitada (Bourinet *et al.*, 2005). Por esta razão, a busca por novas moléculas que sejam eficazes e com efeitos adversos menores é contínua e necessária. Neste sentido, aqui, foram avaliadas as atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas da apocinina, vanilina e do ácido vanílico em modelos de inflamação e dor aguda induzida por agentes químicos e térmicos. Além disso, alguns possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da apocinina foram investigados. A escolha destas substâncias foi baseada na ampla aplicação da apocinina e, para os demais compostos, visando entender como a estrutura destas moléculas poderiam explicar os efeitos observados. No capítulo 5 desta tese foram discutidos os aspectos químicos anti e pró-oxidantes das moléculas aqui estudadas. Aqui, nos deteremos aos resultados farmacológicos obtidos e posteriormente faremos uma integração dos assuntos.

Dados da literatura demonstram que os efeitos farmacológicos da apocinina se estendem a diversas doenças de origem inflamatória tais como: aterosclerose, asma, hipertensão, doenças neurológicas, doenças reumáticas, entre outras (Stefanska & Pawliczak, 2008). Por sua vez, a vanilina possui, além de seus efeitos aromáticos e flavorizantes, indicações terapêuticas como o tratamento de afecções uterinas, doenças hepatobiliares, espasmos, esterilidade e impotência (Moraes & Fontana, 2005). O ácido

vanílico está presente em diversas plantas de usos medicinais como *Amburama cearensis* utilizada em doenças respiratórias (Fontenele *et al.*, 2003 a), *Scrophularia nodosa* utilizada no tratamento de feridas, abscesso, irritações de pele, etc. (Swiatek L., 1973) e também na *Lippia sidoides* que possui ações antimicrobiana comprovadas (Monteiro *et al.*, 2007).

Iniciamos os estudos avaliando e comparando a atividade anti-inflamatória dos compostos estudados por meio do modelo de edema de pata induzida por carragenina. Trata-se de um processo inflamatório agudo, não imune, altamente reprodutível e bem estudado. A carragenina quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação, como edema (tumor), eritema (rubor) e hiperalgesia (maior sensibilidade aos estímulos dolorosos), que se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória. Bradicinina, histamina, serotonina, taquicininas, fragmentos do complemento (C3a e C5a), espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, mediadores lipídicos (ex. prostaglandinas e PAF), citocinas (ex. TNF- α e IL1- β), quimiocinas (ex. IL-8) e enzimas proteolíticas são exemplos dos mediadores envolvidos na resposta do organismo frente a um estímulo inflamatório. A inibição do edema de pata induzido pela carragenina por uma determinada droga é altamente preditiva de ação anti-inflamatória. Em nosso estudo, a apocinina e seus correlatos inibiram de maneira significativa o edema na terceira hora após indução do mesmo. É importante salientar que neste modelo, uma maior liberação de prostaglandinas (principalmente PGE2) ocorre nesta fase (Ferreira *et al.*, 1971., Ferreira *et al.*, 1979., Ferreira *et al.*, 1991) o que parece indicar que a inibição de ciclooxigenases possa estar relacionada ao mecanismo de ação da apocinina. Corroborando com nossos achados, a administração oral de apocinina em ratos inibiu a inflamação de orelha induzida por LPS e

diminuiu os níveis de PGE2 (Hougee *et al.*, 2006). Ainda dentro deste contexto, o ácido vanílico demonstrou uma ação anti-edematogênica, além de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (Leal *et al.*, 2011).

Entre os modelos de nocicepção química utilizados neste trabalho, iniciamos pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este teste é descrito como um modelo de dor inflamatória, sendo uma ferramenta para a avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes (Vinegar *et al.*, 1979; Tjolsen, Hole, 1997). Todos os compostos avaliados apresentaram atividade antinociceptiva neste modelo e novamente não houve diferença significativa entre as substâncias estudadas. Nossos estudos encontram respaldo nos estudos da ação antinociceptiva da vanilina (Park *et al.*, 2009) e ácido vanílico (Morucci *et al.*, 2012), enquanto para a apocinina, não foi encontrado nenhum trabalho relacionado a este modelo experimental.

Sabe-se que a irritação local promovida pelo ácido acético induz a liberação de vários mediadores endógenos como bradicinina, prostaglandinas e citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-8) que estimulam neurônios nociceptivos (Collier *et al.*, 1968; Ikeda *et al.*, 2001). Além de ser influenciada por estes mediadores inflamatórios, a nocicepção promovida pelo ácido acético também pode ser mediada pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam os canais TRPV1 e ASICs localizados nos neurônios aferentes primários (Ikeda *et al.*, 2001; Coutax *et al.*, 2005). Os receptores TRP, (transient receptor potential) constituem uma família de canais catiônicos localizados nos terminais periféricos dos nociceptores e são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos, uma vez que sua ativação contribui para a geração do potencial de ação necessário para a transmissão da informação nociceptiva (Tominaga, 2007). Considerando os resultados obtidos, podemos

sugerir que o efeito antinociceptivo dos compostos estudados possa também estar relacionado à inibição da liberação desses mediadores ou dos canais TRPV1 e ASICs.

Para a avaliação dos compostos estudados em relação aos mecanismos relacionados ao SNC foram utilizados o teste da placa quente e o teste da retirada da cauda. Nos dois modelos experimentais, os compostos estudados não aumentaram o tempo de latência. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo dos compostos não envolve mecanismos centrais relacionados aos modelos que dependem de reflexos espinhais. Sabendo-se que estes testes são bem eficientes em revelar a atividade analgésica de opióides (Carter, 1991) e essa observação foi confirmada pelo fato da morfina (agonista dos receptores opióides) aumentar o tempo de latência nos dois modelos.

Outro modelo de nocicepção amplamente utilizado é o teste da formalina, o qual vem sendo empregado para pesquisa de drogas antinociceptivas em roedores, principalmente ratos e camundongos (Tjolsen & Hole, 1997). Este teste consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído diretamente na pata posterior do animal, sendo conhecido por induzir intensa dor pela estimulação direta dos nociceptores. A dor, causada pela injeção intraplantar de formalina, é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada após a injeção deste estímulo flogístico. Neste modelo, podem ser caracterizadas duas fases distintas de nocicepção que parecem envolver diferentes mediadores (Hunskar & Hole, 1987; Santos & Calixto, 1997a,b). A primeira fase (fase inicial) inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 min, o que se acredita dever-se à estimulação química direta dos nociceptores (Hunskar, Fasmer & Hole, 1985; Hunskar, Berge & Hole, 1986), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A σ (Heapy, Jamienson & Russel, 1997). A

segunda fase (fase tardia) da nocicepção observada nesse modelo, ocorre entre 15-30 min após a injeção de formalina estando a resposta observada relacionada principalmente com a liberação de vários mediadores químicos pró-inflamatórios (Hunnskaar & Hole, 1987; e Tjolsen & Hole, 1997). Segundo os resultados descritos na literatura, a primeira fase está associada com a liberação de vários mediadores químicos, como a substância P, o glutamato e a bradicinina (fase de dor neurogênica), enquanto que na segunda fase, os mediadores químicos detectados foram histamina, serotonina, prostaglandinas e a bradicinina (fase de dor inflamatória), sendo ambas as fases induzidas pelo agente flogístico formalina (Hunnskaar & Hole, 1987, Shibata *et al*, 1989. Tjolsen *et al*, 1992; Correa & Calixto, 1993, Tjolsen & Hole, 1997). Os compostos estudados neste trabalho não apresentam atividade antinociceptiva na fase neurogênica, enquanto na fase inflamatória os compostos apresentaram efeito antinociceptivo pronunciado. Sendo assim podemos inferir que estes compostos podem estar modulando e/ou inibindo a liberação dos mediadores inflamatórios liberados na segunda fase (fase inflamatória). Nossos resultados estão de acordo com dados de literatura onde foi relatado a ação antinociceptiva do ácido vanílico e da vanilina somente na segunda fase (inflamatória) no teste da formalina (Leal *et al*, 2011; Park *et al*, 2009; Morucci *et al*, 2012). Entretanto, mais uma vez, nenhum trabalho foi encontrado em relação à apocinina neste modelo experimental.

Peranteos resultados até aqui apresentados podemos concluir que todos os compostos estudados possuem atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Estas atividades possuem o mesmo padrão de resposta, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os mesmos. Além disso, todos os resultados obtidos sugerem que os mecanismos de ação dessas substâncias parecem estar relacionadas aos mediadores inflamatórios da dor ou ainda a outros nociceptores. Assim, escolhemos a apocinina para os

estudos posteriores, visto os resultados serem semelhantes para os três, mas a apocinina é a molécula mais estudado na atualidade e mais promissora como um potencial anti-inflamatório. De fato, embora a apocinina seja o mais utilizado e não tóxico inibidor do complexo NADPH oxidase, os efeitos farmacológicos não se restringem a este mecanismo, pois são inúmeros os achados disponíveis na literatura e para os quais a simples inibição de NADPH oxidase poderia explicar todos os resultados. Entre eles podemos citar sua aplicação em modelos de osteoartrite e artrite reumatóide (Lafeber *et al.*, 1999), hipertensão (Taylor *et al.*, 2006), câncer (Kless *et al.*, 2006).

Assim, investigamos inicialmente a participação do sistema de transmissão L-Arg/NO na atividade antinociceptiva da apocinina. Sabe-se que a produção de NO está relacionada com a transmissão nociceptiva central, a partir da ação de diversos mediadores pró-inflamatórios (Millan, 1999; 2002). Além disso, a liberação espinal de NO interfere com a nocicepção em vários níveis de transmissão e modulação desta resposta (Meller e Gebhart, 1993). Em nosso trabalho foi demonstrado que o inibidor de NOS, L-NAME possui efeito antinociceptivo na segunda fase (inflamatória) no teste da formalina. O pré-tratamento dos animais com L-ARG, substrato para a enzima NOS, reverte o efeito antinociceptivo causado pelo L-NAME. Entretanto, o pré-tratamento dos animais tanto com L-ARG como com o L-NAME não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo demonstrado pela apocinina, sugerindo que o sistema L-ARG/NO não está diretamente envolvido neste efeito.

Estudos descritos na literatura demonstram que o sistema serotoninérgico está intimamente envolvido no mecanismo de regulação da transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (Millan, 1997; Besson, 1999). Assim, um grande número de drogas vem sendo utilizado para o tratamento de dores crônicas, destacando-se,

os antidepressivos tricíclicos. Vários estudos sugerem que este efeito pode estar relacionado com a melhora do humor (Warm, Bloom & Fridel, 1999), enquanto que outros autores sugerem que eles produzem analgesia por mecanismos mais específicos (Millan, 1999). No entanto, os antidepressivos tricíclicos são tradicionalmente conhecidos por estimular a atividade da serotonina e da noradrenalina pelo bloqueio da captação neuronal (Carlsson et al, 1969; Takur Desai, 1994). Além disso, eles não parecem agir especificamente nos neurônios monoaminérgicos, mas principalmente em outros sistemas neuroquímicos justificando, portanto, a manifestação da resposta analgésica em pacientes não deprimidos (Sharav *et al.*, 1987; Lejon & Boive, 1989). Para o estudo deste sistema serotoninérgico, foi utilizada uma droga inibidora da síntese de serotonina (PCPA). O pré-tratamento com este inibidor foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da apocinina, sugerindo assim, que o mecanismo antinociceptivo da apocinina seja via liberação e/ou síntese de serotonina pelos neurônios pré-sinápticos. Para um melhor entendimento desta via analisamos os subtipos de receptores serotoninérgicos (5HT-₁ e 5HT-₃), para tanto utilizamos antagonistas dos receptores 5HT-1 (WAY 100635) e antagonista dos receptores 5HT-₃ (ondasetron), nossos resultados demonstraram que não houve reversão do efeito antinociceptivo da apocinina com o pré-tratamento dos antagonistas. Isto nos sugere que a apocinina pode não estar atuando nestes receptores, em contrapartida, como descrito anteriormente verificamos que seu efeito antinociceptivo foi revertido com um pré-tratamento com PCPA. Desta maneira podemos sugerir que a apocinina pode estar atuando em algum nível de liberação da serotonina ou estaria agindo em outro tipo de receptor para serotonina, uma vez que existe uma gama de subtipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ e 5-HT₇ (Bardin, 2000). Os diferentes mecanismos de transdução de sinal de cada

tipo de receptor serotoninérgico permitem a observação de efeitos distintos da 5-HT sobre a atividade neuronal.

Avaliando-se ainda outros possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo da apocinina, analisou-se a possível ação antinociceptiva da apocinina na nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Sakurada *et al* (1992) foram os primeiros a demonstrar que a injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de camundongos, causa vigorosa dor, caracterizada por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com a dor de origem neurogênica. A capsaicina é uma amina neurotóxica extraída de plantas do gênero *Capsicum* (pimenta vermelha) que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (Jancso *et al.* 1991). Vários mediadores químicos foram evidenciados na dor neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina, como as neurocininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B), aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e somatostatina entre outros (Gamse *et al.*, 1981; Lembeck, 1988; Santos & Calixto, 1997a,b). Há estudos que demonstraram que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, os quais foram denominados de receptores vanilóides do tipo 1 (TVR1) Caterina *et al*, 1997. Malmberg e Yaksh, 1994 demonstraram que a capsaicina, ativa diretamente as fibras nervosas aferentes primárias e pode levar à produção e liberação de prostaglandina E2 na medula espinhal *in vitro* e *in vivo*. Sakurada *et al*, (1996 a, b), mostraram que a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de capsaicina pode ser mediada, pelo menos em parte, pela produção de óxido nítrico, glutamato e aspartato, além dos neuropeptídeos (SP, NKA, NKB, CGRP). Neste trabalho, observou-se que a apocinina (administrada v.o)

foi capaz de inibir, de forma significativa, a nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongo. É importante ressaltar que este resultado se contrapõe àqueles observado na fase neurogênica do teste da formalina.

O cinamaldeído é um agonista direto dos canais TRPA1, um importante nociceptor. O receptor TRPA1 foi caracterizado como um termorreceptor de frio nocivo (Story *et al.*, 2003). É seletivamente expresso em fibras sensoriais peptidérgicas que também expressam TRPV1, o que explica seu possível papel no processo nociceptivo (Story *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2005. Além disso, McNamara & colaboradores (2007) demonstraram que a formalina ativa as fibras aferentes primárias por meio da ativação direta de canais TRPA1, sendo esta ativação responsável pela primeira fase da nocicepção (neurogênica) induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os dados do presente trabalho demonstram que a apocinina inibiu de forma significativa a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído. Sendo assim, apesar da apocinina não inibir a fase (neurogênica) da nocicepção no teste da formalina, ela pode estar atuando de alguma forma no receptor TRPA1. Outro receptor que detecta o frio é o receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8) (Mckemy, Neuhausser, Julius, 2002; Peier *et al.*, 2002). O TRPM8 é ativado por temperaturas frias moderadas (15 a 25 °C) e por compostos que evocam uma sensação de frescor, como mentol, icilina, eucaliptol e eugenol (Reid, Flonta, 2001; Bandell *et al.*, 2004; Behrendt *et al.*, 2004; Chuang, Neuhausser, Julius, 2004). Em nossos estudos, a apocinina inibiu a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol, desta maneira, podemos inferir que a apocinina pode estar atuando diretamente no receptor TRPM8. Afim de entendermos um pouco mais sobre o efeito antinociceptivo da apocinina, estudamos a participação do sistema glutamatérgico na antinocicepção causada pelo apocinina. Sendo assim, foi investigado o efeito da apocinina na nocicepção induzida pelo glutamato

administrado via intraplantar. Sabe-se que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos. Além disso, tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de glutamato libera aminoácidos excitatórios, PGE₂, NO, cininas, prótons, glutamato e SP no corno dorsal (Millan, 1999; Beirith, Santos, Calixto, 2002). Nesse trabalho, foi observado que a apocinina inibe efetivamente a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato intraplantar. Estes dados permitem sugerir que esta ação antinociceptiva da apocinina na dor causada pelo glutamato pode ser decorrente do seu papel modulatório sobre o sistema glutamatérgico, provavelmente impedindo a liberação desse aminoácido excitatório envolvido na transmissão do processo doloroso. No entanto, novos estudos para uma investigação mais detalhada devem ser conduzidos para confirmar esta hipótese.

A partir dos resultados acima apresentados, podemos concluir que todos os compostos estudados neste trabalho (apocina, vanilina e ácido vanílico) apresentaram efeito antinociceptivo semelhante, em todos os modelos experimentais. Podemos inferir também que este efeito antinociceptivo pode estar envolvido com a inibição de vários mediadores inflamatórios entre eles a prostaglandina E₂, pois a ação destes compostos foi bem pronunciada na terceira hora nos modelos do edema de pata e da hiperalgesia, pois sabe-se que a partir da terceira hora, começa a liberação de vários mediadores inflamatórios, principalmente a prostaglandina E₂. Outro dado também que corrobora com nossos dados, é o efeito antinociceptivo dos compostos, na segunda fase do teste da formalina, da qual é considerada fase inflamatória, devido a liberação de vários mediadores inflamatórios. Como direcionamos nosso estudo para a apocinina, foram então avaliados alguns mecanismo de ação, que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo da apocinina

Sendo assim, perante os resultados obtidos podemos sugerir, que a via NO/L-Arg parece não estar envolvida no efeito antinociceptivo da apocinina, pois quando utilizamos a apocinina concomitantemente com o L-Name ou com L-ARG, o efeito antinociceptivo da apocinina não foi revertido. Estudamos também o sistema serotoninérgico e observamos, que o pré-tratamento com PCPA, foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da apocinina. Para um melhor entendimento desta via, utilizamos um pré-tratamento com antagonistas receptores 5HT-1 (WAY 100635) e antagonista dos receptores 5HT-3 (ondasetron), mas estes não reverteram o efeito antinociceptivo da apocinina, sendo assim podemos sugerir, que a apocinina pode estar atuando diretamente ou indiretamente com os níveis de serotonina ou pode estar atuando em outros subtipos de receptores 5HT-1. No intuito de estudarmos alguns dos principais receptores (TRVR1, TRPA1, TRPM8) envolvidos na gênese da dor. Utilizamos agonistas como capsaicina ((TRVR1), cinamaldeído (TRPA1) e mentol (TRPM8). Nossos estudos demonstraram que a apocinina foi capaz de inibir de forma pronunciada a nocicepção induzida por estes agonistas, sendo assim podemos sugerir que a apocinina pode estar atuando direta e/ou indiretamente nestes tipos de receptores.

Outro resultado importante, encontrado neste trabalho foi a participação do sistema glutamatérgico, uma vez que a apocinina inibiu a nocicepção causada por glutamato, podendo sugerir a participação deste sistema no efeito antinociceptivo da apocinina.

Assim, neste trabalho podemos concluir que os compostos estudados possuem um importante efeito antinociceptivo em modelos de inflamação e nocicepção, podendo ser alvo de futuras drogas analgésicas.

8- Discussão Integradora (Resultados bioquímicos e farmacológicos)

Como estabelecido em nossa justificativa e objetivos, o propósito deste trabalho foi avaliar se havia alguma correlação entre as características químicas anti e pró-oxidante dos compostos em estudo e seus efeitos em modelos de inflamação e dor. A escolha entre eles se deu pelo fato da apocinina ser o mais utilizado inibidor de NADPH oxidase e os outros, apesar de semelhantes, não serem utilizados. Mas, além disso, sendo a apocinina aplicada em tantos modelos *in vitro* e *in vivo* e apresentando resultados biológicos surpreendentes (a literatura já conta com mais de 1300 trabalhos desde a sua descoberta como inibidor de NADPH oxidase em 1994), então até que ponto inibir NADPH oxidase seria o ponto fundamental? De modo geral, os nossos resultados apontam na direção de uma ação mais ampla para esta molécula. De fato, como foi possível observar não obtivemos diferenças significativas entre a apocinina, vanilina e ácido vanílico nos estudos farmacológicos. Assim se considerarmos que a apocinina é bem estabelecida como inibidora de NADPH oxidase, mas o ácido vanílico é muito menos eficiente neste contexto, então pode se concluir que inibição de NADPH oxidase não é o fator principal em nossos achados farmacológicos, visto que ambos foram igualmente eficientes.

Chama a atenção também o fato de que ser anti ou pró-oxidante não parece ser o ponto relevante no mecanismo de ação anti-inflamatória e antinociceptiva das substâncias estudadas. Como demonstramos, a apocinina, uma vez oxidada torna-se uma molécula extremamente pró-oxidante, sendo capaz de induzir a oxidação de diversas classes de biomoléculas. Por outro lado, esta característica é inexistente para o ácido vanílico, o qual, pelo contrário, possui características antioxidantes, embora relativamente fracas, se comparado a compostos de referência como o trolox, forma solúvel de vitamina E. Assim, se considerarmos que esta propriedade pró-oxidante é relevante para a sua ação como

inibidora do complexo NADPH oxidase, então mais uma vez podemos sugerir que nossos resultados não estão diretamente ligados a esta propriedade da apocinina.

Por outro lado, vale ressaltar que, apesar dos nossos achados e conclusões acima descritas, há relatos recentes que mostravam a correlação entre NADPH oxidase e dor; e foi esse um dos principais motivos para apostarmos nas moléculas aqui estudadas. Por exemplo, Brennan *et al*, 2009 demonstrou uma relação entre o receptor NMDA, a enzima NADPH oxidase e apocinina. Eles utilizaram neurônios do hipocampo de ratos em cultura tratando-os com agonistas de receptor de glutamato (NMDA). Estas células responderam com um rápido aumento na produção de superóxido seguido de morte neuronal e foram bloqueados pela apocinina. Moraes *et al*, 2010 estudaram a relação entre hipertensão, dor neuropática e NADPH-oxidase, utilizando a apocinina, neste trabalho eles observaram o efeito analgésico da apocinina na dor neuropática. Apesar da conclusão do referido trabalho em relacionar apocinina com estresse oxidativo, não houve dosagens específicas de produtos de estresse oxidativo, nem parâmetros da ativação do complexo NADPH-oxidase. Outro estudo demonstrou que a ativação da NADPH oxidase espinhal está envolvida no desenvolvimento de hiperalgesia induzida por morfina e a tolerância antinociceptiva foi associada ao aumento da ativação da NADPH oxidase e liberação de superóxido. Sendo assim, a co-administração de morfina com administração sistêmica de dois inibidores da NADPH oxidase, a apocinina ou difenileniodônio (DPI), bloquearam a ativação da NADPH oxidase, do desenvolvimento de hiperalgesia e a tolerância antinociceptiva (Doyle *et al*, 2010).

Assim, confrontando os nossos resultados e estes acima citados, podemos concluir que ainda é cedo para afirmar ou descartar o papel do complexo NADPH oxidase nos mecanismo de dor. Mas uma coisa é certa, a apocinina é certamente uma substância

excepcional do ponto de vista de suas propriedades farmacológicas e muito ainda precisa ser estudado sobre a mesma.

9- Conclusões

- A apocinina e a vanilina são relativamente não efetivas como antioxidantes;
- O ácido vanílico foi mais efetivo como antioxidante;
- A apocinina e a vanilina possuem propriedades pró-oxidantes;
- A apocinina, a vanilina e o ácido vanílico possuem propriedades antinociceptivas;
- O mecanismo de ação antinociceptivo da apocinina parece não envolver a via do óxido nítrico;
- O mecanismo de ação antinociceptivo da apocinina parece envolver a via serotoninérgica;
- Os receptores de capsaicina, cinamaldeído, mentol e glutamato parecem atuar direta e/ou indiretamente no mecanismo de ação antinociceptivo da apocinina.
- Não se verificou interação entre a atividade anti ou pró-oxidante das substâncias em estudo e os efeitos farmacológicos observados;
- Não se verificou interação entre a atividade inibidora de NADPH oxidase e os efeitos farmacológicos observados.

10-Referências Bibliográficas

Abbas, A.K., Janeway, C.A.J.R. Immunology: Improving on Nature in the twenty-Firt Century. **Cell**, v.100, p.129-138, 2000.

Abu-Amer Y. Inflammation, cancer, and bone loss. **Current opinion in pharmacology**, v.9, p.427-433, 2009

Ahmad, KA., Harris, NH., Johnson, AD., Lindvall, HC., Wang, G., Ahmed, K. Protein kinase CK2 modulates apoptosis induced by resveratrol and epigallocatechin-3-gallate in prostate cancer cells.**Molecular Cancer Therapeutics**,v. 6, p.1006-1012, 2007

Albers, J.M.C., Paimela, L., Kurki, P.,et. al.: Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid. **Ann Rehm Dis**. v. 60, p. p.453-458, 2005.

Alhaider, A.A. Antinociceptive effect of ketanserine in mice: involvement of supraspinal 5-HT₂ receptors in nociceptive transmission. **Brain Research**,v.543, p.335-340, 1991 a.

Alhaider, A.A., Lei, S.Z., Wilcox, G.L. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of Gaba. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 1881-1888, 1991 b.

Andrade, E.L., Luiz, A.P., Ferreira, J, Calixto, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**,v. 152, p. 511-20, 2008.

- Ardati, K.O., Bajakiam, K.M., Tabbara, K.S. Effect of glucose-6-phosphate dehydrogenase on neutrophil function. **Acta Haematologica**, v.97, p.211-215, 1997.
- Artigas, F., Romero, L., De Montigny, C., Blier, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant in major depression by 5 HT_{1a} antagonists. **Trends Neuroscience**. v.19, p.378 -383, 1996.
- Bandell M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p. 849-57, 2004.
- Barbieri, S.S., Cavalca, V., Eligini, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, p.156-165, 2004.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal Antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v. 86, p.11-80, 2000.
- Bardin, L., Tarayre, J., Koek, W., Colpaert, F.C. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT, producers, 5HT_{1A}, receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 109-114, 2001.

Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química**, v.29, p.113-123, 2006.

Basbaum, A.I. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv Exp Med Biol**, v.133, p.177-189, 1981.

Basbaum, A.I., Fields, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review Neuroscience**, v.7, p. 309 -338, 1984.

Bentley, G. A., Newton, S. H. & Starr, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **Brasilian Journal Pharmacol**, v.73, p. 325-32, 1981.

Bejarano, I., Espino, J., Barriga, C., Reiter, R.J., Pariente, J.A., Rodríguez, A.B. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p.14-20. 2010.

Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

Besson, J.M., The neurology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

- Bhat, SH., Azmi, AS., Hadi, SM. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties., **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.218, p.249-55. 2007
- Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G. Free radicals and tem nain dietary antioxidants. **Nutrition**, v.12, p.110-118, 1999.
- Bleakman, D., Alt, A., Nisenbaum E.S. Glutamate receptors and pain. **Seminar in Cell an Development Biology**, v.17, p. 592-604, 2006.
- Boess, F.G., Matin, I.L. Molecular biology of 5-HT receptors. **Neuropharmacology**, v.33, p. 275-317, 1994.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoids. **BioFactors**, v. 6, p. 399-402, 1997.
- Bourinet, E., Alloui, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., Mcrory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., Nargeot, J. Silencing of the Cav.,T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrate its major role in nociception. **Embo J**, v. 24, p. 315-324

Brennam, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimbam, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Chan, P.H., Swanson, R.A. NADPH-oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nature Neurosciences**, v. 12, p. 857-863, 2009.

Campos, A.M., Sotomayor, C.P., Pino, E., Lissi, E. A pyranine based procedure for evaluation of the total antioxidants potential (TRPA) of polyphenols. A comparison with closely related methodologies. **Biology Research**, v.37, p. 287-292, 2004.

Chao, J., Jia, L., Zhou HM., Liu, Y., Zhong LF. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological Sciences**, v.91 476-83, 2006.

Carter, G.T., Sullivan, M.D. Antidepressants in pain management. **Current Opinions in Investigational Drugs**, v. 3, p. 454-445, 2002.

Carter, R.B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: Effect of behavioral endpoint. **Pain**, v. 47, p. 211-220, 1991.

Carlsson, A., Corrodi, H., Fuxe, K., Hokfelt, T., Effects of some antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain catecholamine stores by 4, 4-dimethyl-meta-tyramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 367-373, 1969 a.

Carlsson, A., Corrodi, H., Fuxe, K., Hokfelt, T., Effect of antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain 5-hydroxytryptamine caused by 4-methoxy-

α -ethyl-meta-tyramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 357-366, 1969 b.

Cash, J.M., Wilder, R.L. Neurobiology and inflammatory arthritis. **Bulletin on the Rheumatic Diseases.**, V.41, p.1-3, 1992.

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**, v. 389, p. 816-824, 1997.

Ceravolo, GS., Fernandes, L., Munhoz, CD., Fernandes, DC., Tostes, RC., Laurindo, FR., Scavone, C., Fortes, ZB., Carvalho, MH. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. **Hypertension**, v. 50, p.756-761, 2007

Chao, J.C., Yuan, M.D., Chen, P.Y., Chien, SW. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients small star, filled., **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.653-663. 2002 .

Chuang, H.H., Neuhausser, W.M., Julius, D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. **Neuron**, v. 43, p.859-69, 2004

- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br., J., **Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.
- Coyne, T. et. al. Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a populationbased study in Queensland, Australia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, p. 685-693, 2005.
- Corrêa, C.R., Calixto, J.B., Evidence for participation of B₁ and B₂ Kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 193-198, 1993.
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J.C., Le Bars, D., Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms., **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.
- Czirr, E., Wyss-Coray, T. The immunology of neurodegeneration., **Journal of Clinical Investigation**, v.122, p1156-1163, 2012
- D'amour, F.E., Smith, D.L. A method for determining of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v. 72, p. 74-79,1941.
- Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, p. 396-407, 1997.

Devor, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain Supplement**, v.6, p. s27-s35, 1999.

Dray, A., Urban, L., Dickenson, A. Pharmacology of chronic pain. **TIPS**, v.15, p.190-197, 1994.

Droge, W., Free radicals in the physiological control of cell function., **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

Doyle, T., Bryant, L., Muscoli, C., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Chen, Z., Salvemini, D. Spinal NADPH oxidase is a source of superoxide in the development of morphine-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. **Neurociences Letters**, v. 483, p. 85-89, 2010.

Duarte-Almeida, J.M., Negri, G., Salatino, A., Carvalho, J.E., Lajolo, F.M. Antiproliferative and antioxidante activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165-71, 2007.

Eddy, N.B., Leimback, D. Synthetic analgesic II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107. p. 385-393, 1953.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Associação Médica Brasileira.**, v.43, p.61-68, 1997.

- Ferreira, S.H., Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B. The molecular mechanism with its pharmacokinetic properties. **Life Sciences**, v. 201, p. 121-122. 1991.
- Ferreira, S.H., Moncada, S., Vane, J.R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. **Nature (N.Biol.)**, v.231, p.237-239, 1971.
- Ferreira, S.H., Nakamura, M.I. Prostaglandin hyperalgesia a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v.18, p.179-190, 1979.
- Fontenele, J.B., Ribeiro, R.A., Viana, G.S.B. Antiinflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic and chemical constituents from *Amburama cearensis*. **Phytotherapy Research**, v.17, p.335-340, 2003a.
- Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research**, v. 48, p.129-141, 1999.
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J.X., O'Brien, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p. 91-104, 2002.
- Gammon, C.M., Allen, A.C., Morell, P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. **Journal Neurochemistry**, v. 53, p.95-101, 1989.

Gamse, R., Lackner, D., Gamse, G., Leeman, S.E., Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 356, p. 38-41, 1981.

Gant, T.W., Rao, D.N, Mason, R.P. & Cohen, G.M. Redox cyclind and suphydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v.65, p. 157-173, 1988.

Gilloteaux. J., Jamison, J.M., Arnold, D., Ervin, E., Eckroat, L., Docherty, J.J., Neal, D., Summers, J.L., Cancer cell necrosis by autoschiziz: synergism of antitumor activity of vitamin C: vitamin K3 on human bladder carcinoma T24 cells. **Scanning**, v. 20, p.564-75, 1998.

Goldstein, I.M., Malmsten, C.L., Weissmann, G. Prostaglandins, thromboxanes, and polymorphonuclear leukocytes: **Inflammation**, v. 4, p. 17-309, 1977.

HA, H., Hwang, I.A., Park, J.H., Lee, H.B. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropaty. **Diabetes Research Clinical Practice**, Suppl 1, p. 542-545, 2008.

Halliwell, B, Cross, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 5-12, 1994.

Hart, B.A., Simons, J.M, Rijkers., G.T., Hoogvliet, J.C., Van Dijk. H., Labadie, R.P.

Reaction products of 1-naphthol with reactive oxygen species prevent NADPH oxidase activation in activated human neutrophils, but leave phagocytosis intact. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, p. 241-249, 1990.

Heapy, C.G., Jamienson, A., Russel, N.J.W., Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 90, p. 164, 1987.

Higgins, A.J. The biology, pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 1, p. 1-18, 1985.

Hougee, S., Hartog, A., Sanders, A. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.531, p.264-269, 2006.

Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H., Busse, R., Schoröder, R., Brandes, R.P. Apocynin is not inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, p. 211-217, 2008.

Hunskar, S., Berge, O.G., Hole, K., Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.

Hunskar, S., Berge, O.G., Hole, K., Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

Hunskar, S., Hole, K. The formalin test in mice – dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p.103-114, 1987.

Ibrahim, W., et. al. Oxidative stress and antioxidant status in mouse Kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 674-678, 1999.

Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-ishi, S., Involvement of vanilloid receptor VR 1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

Jancsó, G., Hokfelt, T., Lundberg, J.M., Kiraly, E., Halasz, N., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Elde, E., Said, S., Brown, M., immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **Journal Neurocytol**, v. 10, p. 963-980, 1981.

- Jamison, J.M., Gilloteaux, J., Taper, H.S., Summers, J.L. ,Evaluation of the in vitro and in vivo antitumor activities of vitamin C and K-3 combinations against human prostate cancer, **Journal of Nutrition**, v. 131, p.158S-160S, 2001.
- Jhon, S., Kale, M., Rathore, N., Bhatnagar, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 500-524, 2001
- Johnson, DK., Schillinger, KJ., Kwait, DM., Hughes, CV., McNamara, EJ., Ishmael, F., O'Donnell, RW., Chang, MM., Hogg, MG., Dordick, JS., Santhanam, L., Ziegler, LM., Holland, JA. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols., **Endothelium.**, v.9, p.191-203. 2002.
- Jones, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-79, 2006.
- Kanegae, M.P., da Fonseca, L.M., Brunetti, I.L, Silva, S.O., Ximenes, V.F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochemistry Pharmacology**, v.74, p.457-464, 2007.
- Kawai, T., Akira, S. Innate immune recognition of viral infections. **Nature Immunology**, v.7, p.131-137, 2006.

- Khansari, N., Shakiba, Y., Mahmoudi, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer., **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v.3, p. 73-80, 2009 .
- Khan, A.A., Dionne, R.A. The COX-2 inhibitors: new analgesic and anti-inflammatory drugs. **Dental Clinics of North America**, v. 46, p. 679-90, 2002.
- Kim, S.Y. et.al. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. **FoodChemistry**, London, v.97, p. 472-479, 2006.
- Kless, R.F., De Marco, P.C., Salaszyk, R.M. Apocynin derivatives interrupt intracellular signaling resulting in decreased migration in breast cancer cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2006, pag, 2006.
- Konietzkn, F., Hensel, H. Letters and notes: Warm fiber activity in human skin nerves. **Pflugers. Archives**, v.359, p.265-267, 1975.
- Konishi, M., Sugiyama, S., Sato, Y., Oshima, S., Sugamura, K., Nozaki, T., Ohba, K., Matsubara, J., Sumida, H., Nagayoshi, Y., Sakamoto, K., Utsunomiya, D., Awai, K., Jinnouchi, H., Matsuzawa, Y., Yamashita, Y., Asada, Y., Kimura, K., Umemura, S., Ogawa H. Pericardial fat inflammation correlates with coronary artery disease. **Atherosclerosis**. v.213:649-655, 2010

Krause, M.V., Mahan, L.K. Alimentos, nutrição e ditoterapia. 11. Ed. São Paulo: Roca,. 2005.

Kumar., R., Clermont, G., Vodovotz, Y., Chow, CC., The dynamics of acute inflammation., **Journal of Theoretical Biology**, v.230, p.145-55, 2004.

Lafeber, F.P.J.G., Beukelman, C.J., van den Worm, E. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.38, p. 1088-1093, 1999.

Lambert, JD., Elias, RJ., The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention., **Current medicinal chemistry**, v.15, p.1840-50, 2010.

Laurson, KR., McCann, DA., Senchina, DS. Age, sex, and ethnicity may modify the influence of obesity on inflammation., **Journal Investigative Medicine**. v.59. p.27-31, 2011.

Leal, L.K.A.M., Pierdoná, T.M., Góes, J.G.S., Fonsêca, K.S., Canuto, K.M., Silveira, E.R. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburama cearensis* A.C Smith., **Phytomedicine**, v.18, p. 230-233, 2011

Lee, YC. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. **Current Rheumatology Reports**. v. 15, p. 130-135, 2013.

Leijon, G., Boivie, J., Central post-stroke pain: a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. **Pain**, v. 36, p. 27-36, 1989.

Lembeck, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 133, p. 435-454, 1988.

Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature Publishing Group**. v.420, p.868-74. 2002.

Loeser, J. D., Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

Malmberg, A.B., Yash, T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E₂ release in spinal cord slice: Relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p.293-299, 1994.

Malmberg, A.B., Yash, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behavior and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 1069-1075, 1995.

Mangge, H., Almer, G., Truschnig-Wilders, M., Schmidt, A., Gasser, R., Fuchs, D.

Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. **Current Medicinal Chemistry**. v. 17, p.4511-4520, 2010.

MacDonald-Wicks, L.K., Garg, M.L. Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 211-218, 2003.

McGeer, P.L., McGeer, E.G. Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1035, p.104-116, 2004.

McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M., TRPA 1 mediates formalin-induced pain., **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, n.33, p. 1325-1330, 2007.

Martins, J.O., Wittlin, B.M., Anger, D.B., Martins, D.O., Sannomiya, P., Jancar, S. Early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats: role of insulin on the signaling pathways and mediators. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.26, p.739-748, 2010.

Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K. M., Smith, W.G., Isakson, P.C., Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is

noninflammatory and non-ulcerogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3228–3232, 1994.

Meller, S.T., Cummings, C.P., Traub, R.J., Gebhart, G.F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**, v.60, p.367-374, 1994.

Meller, S.T., Gebhart, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v.52, p.127-136, 1993.

Mc Queen, D.S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory and circulatory systems. **British Medical Bulletin**, v.39, p.77-82, 1983.

Millan, M.J., The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the Modulation of nociception: Focus on receptor multiplicity In: **The pharmacology of Pain** (ed. Dickenson, A., and Besson, J.M.), p. 385-446, Springer, Berlin, 1997.

Millan, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 569, p. 1-120, 2002.

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.

Monteiro, M.V., Melo Leite, A.K., Bertini, L.M., Moraes, S.M., Nunes, D.C. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidants effects of the essential oil of *Lippia sidoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.378-382, 2007.

Moraes, C.P., Fontana, C.A.D. Apontamentos sobre *Vanilla planifolia*. **Boletim da Coordenadoria das Associações das Orquidófilas do Brasil**, v.4, p.99-101, 2005.

Morais, M.F.C., Pinho, D., Teixeira, A.A. Dor neuropática: avaliação de mecanismos num modelo experimental. **Revista Dor** (Faculdade de Medicina Universidade do Porto),, Abril, p.1-10, 2010.

Mora-Pale, M., Weïwer, M., Yu, J., Linhardt, R.J., Dordick, J.S. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols., **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 46-52, 2009.

Muijsers, R.B.R., Worm van der, E., Folkerts, G. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. **British Journal of Pharmacology**, v.130, p.932-936, 2001.

Mukherjee, J., Sarkar, D., Sharma, A. Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on mouse bone marrow chromosomes in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 657-661, 1997.

Morucci, F., Lopez, P., Miño, J., Ferraro, G., Gorzalcznany, S. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.401-406, 2012.

Naik, S.R., Wala, S.M. Inflammation, allergy and asthma, complex immune origin diseases: machanisms and therapeutic agents. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v.7, p. 62-95, 2013

Nauseef, W.M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochemistry and Cell Biology**, v.122, p.277-291, 2004.

Nestler, J.L. Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. **Critical Reviews in Neurobiology**, v.7, p.23-39, 1993.

Noroozi, M., Angerson, WJ., Lean, ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes., **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.67, p.1210-1218, 1998.

Noto, V., Taper, H. S., Jiang, Y. H., Janssens, J., Bonte, J. & De Loecker, W. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K3) treatment on human tumor cell growth in vitro., I., Synergism of combined vitamin A and K3 action. **Cancer**, v. 63, p. 901-906, 1989.

Núñez Delicado, E., Sánchez Ferrer, A., García Carmona, F. A kinetic study of the one-electron oxidation of trolox C by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase. **Acta of biochemical and biophysics**, v. 1335, p. 127-134. 1997

Nutter, L.M., Ngo, E.O., Fisher, G.R., Gutierrez, P.L. DNA strand scission and free radical production in menadionetreated cells. Correlation with cytotoxicity and role of NADPH quinone acceptor oxidoreductase., **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p 2474-2479, 1992.

Obata, H., Saito, S., M., Ishizaki, K., Goto, F. Antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. **Pain**, v. 90, p. 173-179, 2001.

Ozek, M., Uresin, Y. Gungor, M. Comparison of the effects of specific and non-specific inhibition on nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. **Life Science**, v.72, p.1743-1751, 2003.

Osiecki, M., Ghanavi, P., Atkinson, K., Nielsen, L.K., Doran, M.R. The ascorbic acid paradox. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 4, p. 466-70, 2010.

Park, S.H., Sim, Y.B., Choi, S.M., Seo, Y.J, Kwon. M.S., Lee, J.K., Suh, H.W. Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered vanillin in the mice. **Archives of Pharmacology Research**. v. 32, p.1643-1649, 2009.

- Paterniti, I., Galuppo, M., Mazzon, E., Impellizzeri, D., Esposito, E., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., Leukoc, J. Protective effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase activity, in splanchnic artery occlusion and reperfusion., **Biology**, v.88, p.993-1003, 2010
- 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**, v. 108, p. 705-15, 2002.
- Peters, E.A., Hiltermann, J.T.N., Stolk, J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, p.156-165, 2004.
- Petersen, M., Banchet, G.S.V., Heppelmann, B., Koltzenburg, M. Nerve growth the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75. **Neuroscience**, v.83, p.161-168, 2001.
- Phero, J.C., Becker, D.E., Dionne, R.A. Contemporary trends in acute pain management. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, p. 209-16, 2004.

Pichorner, H., Metodiewa, D., Winterbourn, C.C. Generation of superoxide and tyrosine peroxide as a result of tyrosyl radical scavenging by glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 323, p.429-37, 1995.

Puddu, P., Puddu, G.M., Cravero, E., Rosati, M., Muscari, A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. **Blood Pressure**, v.17, p.70-77, 2008.

Randall, L.& Selitto, J.J. A Method fo measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archvies Pharmacodnamies**, v.111, p. 409-419, 1957.

Reichling, D.B., Levine, J.D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain suppl**, v. 6, p. s103-s109, 1999.

Riganti, C., Costamagna, C., Doublier, S., Miraglia, E., Polimeni, M., Bosia, A., Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress., **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, p.277-285. 2006.

Reid, G., Flonta, M.L. Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**, v. 413, p. 480, 2001.

Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A., Bartosz, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells., **Cell Biology International**, v. 3, p.1245-1250. 2007.

- Robinson, D.R. Eicosanoids, inflammation, and anti-inflammatory drugs. Clinical and **Experimental Rheumatology**, v. 7, p. 155-61, 1989.
- Rosen, F.S., Eibil, M., Roiffman, C., Fischer, A., Volanakis, J., Aiuti, F. Primary Immunodeficiency diseases. Clinical and experimental **Immunology**, v.118, p.1-28, 1998.
- Rueff, A., Dray, A. Pharmacological characterization of the effects of 5- hydroxyptamine and different prostaglandins on peripheral sensory neurons *in vitro*. **Agents & Actions**, v.38, p.13-15, 1993.
- Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T., Mori, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters**, v. 199, p. 139-145, 2003.
- Sandur, S.K., Ichikawa, H., Pandey, M.K., Kunnumakkara, A.B., Sung, B., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane)., **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p.568-80, 2007 .
- Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K., The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord., **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K., Hara, A., Abiko, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin-and glutamate-Induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, p. 271-278, 1996 a.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tan-no, K., Yonezawa, A., Sakurada, S., Kisara, K. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sciences**, v. 59, p. 921-930, 1996 b.

Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K., The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonista in the spinal cord., **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K., Hara, A., Abiko, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin-and glutamate-Induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, p. 271-278, 1996 a.

Sakurada, T., Sugiyama, A., Sakurada, C., Tan-no, K., Yonezawa, A., Sakurada, S., Kisara, K. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sciences**, v. 59, p. 921-930, 1996 b.

Santos, A.R.S., Calixto, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor Subtypes in formalin and models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-389, 1997 a.

Santos, A.R.S., Calixto, J.B. Ruthenium and capsazepine antinociceptive effect in formalina and capsaicin models of pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 235, p. 73-76, 1997 b.

Santos, A.R., Calixto, J.B., Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381-9, 1999

Santos, F.G., Ximenes, V.F., Fonseca, L.M., Faria Oliveira, O.M., Brunetti, I.L. Horseradisch peroxidase-catalyzed oxidation of rifampicin: reaction rate enhancement by co-oxidation with anti-inflammatory drugs. *Biology Pharmacol Bull*, v.28, p. 1822-1826, 2005

Sazaki, M., Ishizaki, K., Obata, H., Goto, F. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin to the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 424, p. 45-52, 2001.

Sawynok, J., Reid, A. Interactions of descending serotonergic systems with other neurotransmitters in the modulation of nociception, *Behav. Brain Research*, v.73, p. 63-68, 1996.

Schramm, D.D., German, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Journal Nutrition Biochemistry**, v.9, p.560-66, 1998.

Schlüter, T., Steinbach, A.C., Steffen, A., Retting, R., Grisk, O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. **Cardiovascular Research**, v. 80, p.271-9. 2008.

Seril, D.N., Liao, J., Yang, G.Y., Yang, CS., Oxidative stress and ulcerative colitis-**Carcinogenesis**, v.24, p.353-62. 2003.

Sharav, Y., Singer, E., Schmidt, E., Dionner, A., Dubner, R. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. **Pain**, v.31, p. 199-209, 1987.

Sherwood, E.R., Toliver-Kinski, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v.18, p. 385-405, 2004.

Shibata, M., Ohkudo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalina test characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

Sies, H, Stahl, W. Vitamins E and C, Beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315-1321,

Simon, S.I., Green, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment

during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, p. 151-85, 2005.

Simons, JM., Hart, BA., Ip Vai Ching, TR., Van Dijk, H., Labadie, RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils., **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p.251-258, 1990.

Simić, A., Manojlović, D., Segan, D., Todorović, M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. **Molecules**, v. 12, p. 2327-40, 2007.

Stefanska, J., Pawliczak, R. Apocynin: Molecular aptitudes. **Mediators of Inflammation**, p. 1-10, 2008.

Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkaman, J.H., Verhoeven, A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substitute catechol. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.11, p.95-102, 1994.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., ANKTM 1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures., **Cell**, v. 112, p. 819-29, 2003.

Suphim, B., A, Prawan., AU.Kukongviriyapa., S, Kongpetch., B. Buranrat V. Kukongviriyapan., Redox modulation and human bile duct cancer inhibition by curcumin. **Food And Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2265-2272, 2010

Swiatek, L. Phenolics acids of underground parts of *Scrophularia nodosa* L. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 25, p.461-464, 1973.

Tang, L.L., Ye, K., Yang, F.X., Zheng, J.S. Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. **Journal of International Medical Research**, v.35, p.517-522, 2007.

Taylor, N.E., Glocka, P., Liang, M., Cowley Jr, W. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. **Hypertension**, v. 47, p.692-698, 2006.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., The formalin test: an evaluation of method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

Tjolsen, A., Hole, K., Animal models of analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J.M., The pharmacology of pain., **Berlin: Springer-Verlag**, p. 1-20, 1997.

Tominaga, M., Nociception and TRP channels., **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 179, p. 489-505, 2007.

Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H., Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v.358, p.1-3, 1995.

Ushio-Fukai, M., Nakamura, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 266, p.37-52, 2008.

Van der Placken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M.E. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. **Journal Agriculture Foods Chemical**, v.53, p. 5726-5733, 2005

Vane, J.R., Botting, R.M.A. Better understanding of ant-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 e COX-2). **Adv Prostaglandin Tromboxane Leukotriene Research**, v. 23, p.41-48,1995.

Vejrazka, M., Miker, R., Stipek, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.11, p. 1772, 2005.

Vinay, Kumar., Abbas, A.K., Nelson Fausto. Robbins e Cotran: **Patologia Bases patológicas das doenças**, 7ed, p.1504, 2005.

Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., Johnston, P.R., Antagonism of pain and hyperalgesia. In: Vane, J.R., Ferreira, S.H., **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin: Springer- Verlag, p. 208-222, 1979.

Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. Química Orgânica, estrutura e função. v. 4, **ed. Porto, Alegre: Bookman**, 2004.

Ward, N.G., Bloom, V.L., Friedel, R.O., The effectiveness of tricyclic antidepressants in the treatment of coexisting pain and depression., **Pain** v. 7, p. 311-338, 1999.

Wei, Y., Whaley-Coneel, A.T., Chen, K., Habibi, J., Uptergrove, G.M., Clark, S.E., Stump, C.S., Ferraro, C.M., Sowers, J.R. NADPH oxidase contributes to vascular inflammation, insulin resistance, and remodeling in the transgenic (mRen2) rat. **Hypertension**, v.50, p.384-391, 2007.

Wilkinson, B.L., Landreth, G.E. The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v.9, p.3-30, 2006.

Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M.E., Ho, H., Schmidt, H.H., Wingler, K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, p. 885-98, 2010.

Winter, C.A., Risley EA, Nuss GM. Carrageenan induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol**, v.111, p. 544-47,1962

Worm van der, E., Beukelman, C.J., Berg, A.J.J., Kroes, B.H., Labadie, R.P., Van Dijk, H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v.433, n.2-3, p.225-230, 2001.

Ximenes, V.F., Kanegae, M.P., Rissato, S.R., Galhiane, M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.457, p.134-141, 2007.

Zhang, Y., Chan, M.M.K., Andrews, M.C. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p.910-916, 2005.