

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO
DICLOFENACO DE SÓDIO COM SILDENAFIL
NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA**

CAMILA GARCIA SALVADOR

**Florianópolis
2011**

CAMILA GARCIA SALVADOR

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO
DICLOFENACO DE SÓDIO COM SILDENAFIL
NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogerio Tonussi

**Florianópolis
2011**

AGRADECIMENTOS

À Deus, guia espiritual no qual pude depositar minha fé, reencontrando ânimo, força e alegria para concluir esta etapa.

Ao meu orientador, Professor Carlos Rogerio Tonussi pelos ensinamentos e atenção dispensados.

À Taciane, por toda atenção e ajuda durante a realização dos experimentos e Elisângela, pela colaboração especial e essencial na conclusão do trabalho.

Às minhas companheiras de viagem, Camila e Patrícia, que se tornaram grandes amigas; agradeço pelos momentos maravilhosos, apesar de todo o cansaço e dificuldades que encontramos durante este período.

Ao Douglas, pelo amor e apoio; sem eles seria impossível a conclusão desse trabalho.

Todo mundo é capaz de dominar uma dor, exceto quem a sente.
(William Shakespeare)

RESUMO

O sildenafil é um inibidor seletivo e potente da fosfodiesterase seletiva de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que catalisa a hidrólise do GMPc. Recentemente, o sildenafil demonstrou efeito antinociceptivo em modelos animais após administração local, periférica e sistêmica, além de potenciar a antinocicepção do diclofenaco. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-edematogênico do diclofenaco com sildenafil no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Foram administradas doses crescentes de sildenafil (0,01; 0,1 e 1,0 mg/Kg) e diclofenaco (0,25; 0,5; 2,5 e 5,0 mg/Kg) separadamente a grupos de seis animais. Posteriormente, foi administrado sildenafil e diclofenaco associados nas doses de 0,01 mg/Kg e 0,25 mg/Kg respectivamente. Cada grupo com seis animais recebeu uma hora antes do estímulo inflamatório (carragenina) a dose referente a cada dose testada. No presente estudo, o diclofenaco teve ação anti-edematogênica sozinho em todas as doses testadas, porém, a resposta observada não foi sempre diretamente proporcional à dose aplicada. Já o sildenafil mostrou-se pró-edematogênico quando utilizado sozinho e, quando utilizado em dose subefetiva associado ao diclofenaco, inibiu a ação anti-edematogênica do diclofenaco. Os resultados sugerem que o sildenafil pode interferir negativamente com terapias anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Sildenafil, Diclofenaco, Carragenina.

ABSTRACT

Sildenafil is a selective and potent inhibitor of cyclic guanosine monophosphate selective phosphodiesterase, which catalyzes the hydrolysis of cGMP. Recently, it has been shown that sildenafil causes analgesia in animal models after local, peripheral and systemic treatment, and also enhanced the diclofenac antinociceptive effect. The aim of this study was to investigate whether sildenafil can also modify the antiedematogenic effect induced by diclofenac in the carrageenan-induced paw edema in rats. Increasing doses of sildenafil (0,01; 0,1 and 1,0 mg/Kg) and diclofenac (0,25; 0,5; 2,5 and 5,0 mg/Kg) were applied in groups of six animals. Subsequently, sildenafil was administered associated with diclofenac at the doses of 0,01 mg/Kg and 0,25 mg/Kg respectively. Groups of six animals received the doses tested one hour after the subcutaneous injection of the inflammatory stimulus (carrageenan). The results of this study showed that diclofenac has potent antiedematogenic action when administered alone, however, the response observed was not dose dependent. Sildenafil was shown to be pro-edematogenic when used alone. When diclofenac was used in combination with a sub-effective dose of sildenafil, the antiedematogenic effect of diclofenac was abolished. These results suggest that sildenafil may interfere negatively with anti-inflammatory therapies.

Key-words: Sildenafil, Diclofenac, Carrageenan.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental	24
FIGURA 2 -	Imersão da pata do animal para verificação do volume do edema.....	24
FIGURA 3 -	Esquema da imersão da pata do animal para verificação do volume do edema	25
FIGURA 4 -	Efeito da administração de doses crescentes de diclofenaco (0,5; 2,5 e 5,0 mg/Kg i.p.) ou solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas	28
FIGURA 5 -	Efeito da administração de doses crescentes de sildenafil (0,01; 0,1 e 1,0 mg/Kg i.p.) ou solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas	29
FIGURA 6 -	Efeito da administração de diclofenaco e sildenafil associados (0,25 mg/Kg de diclofenaco + 0,01 mg/Kg de sildenafil i.p.), a dose de 0,01 mg/Kg de sildenafil, 0,25 mg/Kg e 5,0 mg/Kg de diclofenaco e solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas	31
FIGURA 7 -	Estômago após administração de 5,0 mg/Kg de diclofenaco de sódio	32
FIGURA 8 -	Estômago de um animal do grupo controle após administração de salina	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT	-	5-hidroxitriptamina
AINE	-	Antiinflamatório não esteróide
AMP	-	Adenosina 3'5'-monofosfato
AMPc	-	Adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
Ca ⁺²	-	Íon cálcio
COX	-	Ciclooxigenase
G	-	Gramas
g/ml	-	gramas por mililitro
GMP	-	Guanosina monofosfato
GMPc	-	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	-	Guanosina trifosfato
H	-	Hora
i.p.	-	Intraperitoneal
MG	-	Miligramas
mg/Kg	-	Miligramas por quilo
ml	-	Mililitros
N ^o	-	Número
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NO	-	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
NOS	-	Óxido nítrico sintase (do inglês <i>nitric oxide synthase</i>)
eNOS	-	Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
iNOS	-	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
nNOS	-	Óxido nítrico sintase neuronal (do inglês <i>neuronal nitric oxide synthase</i>)
PDE	-	Fosfodiesterases (do inglês, <i>phosphodiesterase</i>)
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet derived growth factor</i>)
PG	-	Prostaglandinas
PKG	-	Proteína quinase G
PMN	-	Neutrófilos polimorfonucleares
s.c.	-	Subcutânea
TNF	-	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. INFLAMAÇÃO	13
1.2. HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA	14
1.3. SILDENAFIL	16
1.4. DICLOFENACO	17
1.5. EDEMA DE PATA DE RATO INDUZIDO POR CARRAGENINA	18
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. ANIMAIS	22
4.2. DROGAS E REAGENTES	22
4.3. MODELOS EXPERIMENTAIS	22
4.3.1. Verificação da atividade anti- edematogênica	22
4.3.2. Avaliação da toxicidade	26
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	27
5.1. CURVA DOSE-RESPOSTA DO DICLO- FENACO	27
5.2. CURVA DOSE-RESPOSTA DO SILDENA- FIL	28
5.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO DI- CLOFENACO ASSOCIADO AO SILDE- NAFIL	30
5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	32
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma resposta vascular dos tecidos e do sangue a uma lesão (Cranshaw & Griffiths, 2003). Esta lesão é causada por um agente etiológico, que pode ser químico, físico, biológico e, também, degenerações ou necroses tissulares ou alterações nas respostas imunológicas (Carbonari, 2005).

O processo de reparo se inicia imediatamente após a lesão através da liberação de citocinas, numerosa família de peptídeos que incluem interferons, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento e compostos de baixo peso molecular liberados a partir de soro e de vasos sanguíneos lesados e da degranulação de plaquetas, como histamina e 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Werner & Grose, 2003).

Cornelius Celsus, no século primeiro, descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor (Boleta-Ceranto *et al*, 2005); ou seja, em nível macroscópico, a área inflamada apresenta-se avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, havendo interferência ou alteração na função.

Os eventos que ocorrem durante a resposta inflamatória inata são vasodilatação e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática, que levam à formação de edema. Esses eventos levam a um aumento local da concentração de mediadores de origem plasmática, entre eles os componentes do sistema complemento como anafilotoxinas C3a e C5a, componentes da coagulação, do sistema fibrinolítico e das cininas e resultam em extravasamento de fluídos e acúmulo de leucócitos no local da inflamação, que representam os eventos celulares. Os mediadores químicos inicialmente liberados por plaquetas e mastócitos, entre eles histamina, serotonina e prostaglandinas, causam aumento da permeabilidade vascular e provocam vasodilatação (Posadas *et al*, 2004). Dessa forma, favorecem a quimiotaxia dos leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos/macrófagos que têm como função, combater os agentes invasores e realizar a fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual (Mollinedo *et al*, 1999).

Os leucócitos chegam ao local da inflamação devido às substâncias quimioatraentes, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Ele é liberado imediatamente após a lesão e apresenta propriedades quimiotáticas sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. O processo de migração se inicia com a captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio e, finalmente, adesão firme e transmigração. A mobiliza-

ção adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações fagocíticas e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo (Werner & Grose, 2003).

Algumas horas após a lesão inflamatória, células brancas sanguíneas começam a invadir o tecido. Os neutrófilos são os primeiros a chegarem, seguidos pelos monócitos e linfócitos. Eles produzem uma grande variedade de proteinases e estão envolvidos na fagocitose de restos celulares (Werner & Grose, 2003). Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro ao fagocitar e matar os microorganismos invasores. Já os monócitos em maior quantidade no final da fase aguda da inflamação e em processos crônicos. Também ocorre a migração de eosinófilos, principalmente em infecções parasitárias e processos alérgicos (Mollinedo *et al*, 1999).

O sistema imunológico inicia a produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas sintetizadas por macrófagos ativados, que induzem a síntese e expressão de moléculas de adesão específicas. Estes agem como mensageiros secundários induzindo a síntese e expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e células brancas (Levy, 1996).

Após o aumento da permeabilidade vascular, há infiltração celular. Na fase aguda, principalmente, neutrófilos contribuem para a resposta inflamatória produzindo mediadores, entre eles radicais livres derivados de oxigênio, entre eles, o ânion superóxido. Os níveis de mieloperoxidase nos tecidos são considerados bons marcadores da infiltração de neutrófilos nos tecidos e podem ser relacionados com a severidade da doença (Posadas *et al*, 2004).

Existem vários mediadores envolvidos na inflamação. Histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (PG) estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular. Outro importante mediador na inflamação aguda é o óxido nítrico (NO) que é produzido por três isoformas distintas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). Esta é produzida somente em condições fisiopatológicas (Moncada e Higgs, 1991). No local da inflamação o NO é produzido por um número diferente de células, incluindo leucócitos, células endoteliais e células nervosas sensoriais (Posadas *et al*, 2004).

1.2. HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA

Uma das características fundamentais de estados inflamatórios é que estímulos normalmente inócuos são capazes de produzir dor em uma região do corpo que se encontra inflamada (Kidd & Urban, 2001).

O mecanismo da hiperalgesia inflamatória resulta de ações excitatórias de mediadores endógenos, tais como prostaglandinas, que estimulam nociceptores (Jorge *et al.*, 2006). Estes mediadores podem exercer dois tipos de efeitos sobre a nocicepção, de forma independente ou concomitante, como a ativação direta dos nociceptores ou a sensibilização destes a outros estímulos ativadores (térmicos, mecânicos ou químicos) (Tonussi e Ferreira, 1997). A nocicepção pode ser definida como a detecção de estímulos nocivos e a subsequente transmissão de informações codificadas para o cérebro, ou seja, a dor é essencialmente um processo perceptivo que surge em resposta a essa atividade (Kidd & Urban, 2001).

Os sinais e sintomas resultantes de estímulos de alta intensidade em tecidos normais refletem, geralmente, a intensidade, localização e tempo de início dos estímulos. Já a dor decorrente de tecidos inflamados ou feridos pode surgir espontaneamente, mesmo na ausência de um gatilho externo, devido há hiperalgesia inflamatória (Kidd & Urban, 2001), ou seja, o local inflamado pode estar dolorido mesmo que não tenha um estímulo doloroso.

Alternativamente, as respostas aos estímulos nocivos podem ser aumentadas (hiperalgesia) ou estímulos normalmente inócuos podem produzir dor (alodinia). Estas características não são específicas e, por si só, não permitem o reconhecimento de diferentes mecanismos fisiopatológicos (Kidd & Urban, 2001).

O sistema nervoso simpático pode modular as funções dos nociceptores por um aumento neuronal de Ca^{2+} adenosina 3'5'-monofosfato (AMPC). A dor na inflamação depende da estimulação de proteína quinase dependente do mecanismo da AMPC – proteína quinase A. Os níveis no citosol de AMPC e GMPc são controlados por fosfodiesterases periféricas. As duas maiores famílias de fosfodiesterases estão envolvidas na nocicepção, incluindo a fosfodiesterase-4AMPC seletiva e a fosfodiesterase-5GMPc seletiva. (Bezerra, 2008).

Várias pesquisas sugerem o envolvimento do GMP (guanosina monofosfato) cíclico (GMPc) na antinocicepção central e periférica (Ferreira e Nakamura, 1997; Sousa e Prado, 2001). Um estudo baseado na observação de que administração local de L-arginina produz antinocicepção em ratos com hiperalgesia induzida por carragenina (Espinosa et al, 2001) reforça demonstrações de que o GMPc está envolvido na antinocicepção. (Boleta-Ceranto *et al*, 2005).

Observações indiretas também demonstraram que o óxido nítrico/GMPc está envolvido na antinocicepção (Ferreira *et al*, 1999; Tao *et al*, 2000). Evidências indicaram também que a antinocicepção produzida pela dipirona, diclofenaco, ketorolac, nimesulida e meloxicam podem ser diminuídas tanto por inibidores da óxido nítrico-sintase quanto inibidores da guanilato ciclase, tais como N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME) e 1H [1,2,4]-oxidiazol[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), respectivamente (Tonussi & Ferreira, 1994; Granados-Soto *et al*, 1995; Lorenzetti & Ferreira, 1996; Islas-Cadena *et al*, 1999; Aguirre-Bañuelos & Granados-Soto, 2000). Portanto, esta evidência sugere a participação do mecanismo óxido nítrico-GMPc na antinocicepção destas drogas anti-inflamatórias não esteroidais.

AMPC e GMPc são sintetizados por adenilato e guanilato ciclasas e são degradados por fosfodiesterases seletivas. Bioquimicamente, a guanilato ciclase catalisa a formação de GMPc a partir de GTP (guanosina trifosfato). Considerando que a fosfodiesterase metabolizadora de GMPc catalisa a hidrólise de GMP cíclico em GMP, a concentração de GMPc intracelular é regulada pela ação da guanilato ciclase e a taxa de degradação da fosfodiesterase do GMPc. (Yoon *et al*, 2009).

A família de proteínas das fosfodiesterases (PDE) é composta por 11 membros e uma grande quantidade de formas e variações. Após a caracterização da PDE-5, intensas pesquisas permitiram obter informações detalhadas sobre esta enzima. Hoje, sabe-se que PDE-5 é expressa em células musculares lisas, que expressam também a proteína quinase (PKG) por GMPc (Dunkern e Hatzelmann, 2004).

Os nucleotídeos cíclicos têm sido reconhecidos como segundos mensageiros de vias de ativação intracelular que regulam quinases e canais iônicos. Essa característica levou ao desenvolvimento de fármacos que interferem com a regulação dos níveis de AMPC e GMPc em várias doenças. (Dunkern e Hatzelmann, 2004).

1.3. SILDENAFIL

O sildenafil é um inibidor seletivo e potente da fosfodiesterase seletiva de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que catalisa a hidrólise do GMPc e tem um efeito relaxante sobre as células musculares lisas, inclusive das arteríolas do corpo cavernoso. É amplamente conhecido devido à sua eficácia terapêutica no tratamento da disfunção erétil através do aumento de GMPc intracelular. Enquanto apresenta um excelente perfil de segurança e tolerância no tratamento da disfunção erétil, sildenafil fornece vários benefícios em outras doenças. Foi sugerido que o

aumento dos níveis de GMP cíclico intracelular e maior disponibilidade de óxido nítrico em diversos tecidos estão também associados à atividade antinociceptiva do sildenafil (Bezerra *et al*, 2008).

Visto que plaquetas humanas contém PDEs 2 e 3 e altas concentrações de PDE 5, não é surpresa que o sildenafil suprima *in vitro*, até certo ponto, a agregação plaquetária induzida por agonista. Isso pode ser verificado em casos de sangramento hemorroidário e aparecimento de varizes agudas após ingestão de sildenafil. No entanto, seu número é limitado, levantando dúvidas sobre a causa desses efeitos colaterais de sildenafil em plaquetas (Dunkern e Hatzelmann, 2004).

Inibidores da PDE-5 sozinhos não afetam a agregação plaquetária *in vitro*, mas eles potencializam os efeitos inibitórios do óxido nítrico, que pode estar presente em diferentes partes do corpo do paciente, por exemplo, nos pulmões. Assim, parece que o efeito inibitório dos inibidores da PDE-5 sobre as plaquetas é limitado por outros mecanismos, além da disponibilidade de óxido nítrico *in vivo* (Dunkern e Hatzelmann, 2004).

No tratamento da hipertensão pulmonar, o sildenafil age relaxando a parede e diminuindo a resistência dos vasos das artérias. Devido à presença de PDE-5 nas paredes arteriais, músculo liso e pulmões, o sildenafil age nessas áreas, induzindo a vasodilatação (Uthayathas *et al*, 2007).

Recentemente, o sildenafil demonstrou efeito antinociceptivo em modelos animais após sua administração local, periférica e sistêmica (Ambriz-Tututi *et al*, 2005; Asomoza-Espinosa *et al*, 2001; Jaim, 2001).

1.4. DICLOFENACO

As drogas anti-inflamatórias não esteroidais bloqueiam a síntese de prostaglandinas, prevenindo a sensibilização periférica de receptores da dor (Jorge *et al*, 2006).

O diclofenaco de sódio, derivado do ácido fenilacético, é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) comprovado, comumente prescrito, que possui propriedades analgésica, anti-inflamatória e antipirética. Este medicamento tem demonstrado eficácia no tratamento de uma variedade de dores agudas e crônicas e doenças inflamatórias. Assim como acontece com todos os AINEs, o diclofenaco exerce sua ação pela diminuição da síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxigenase (COX), que é importante na resposta inflamatória (GAN, 2010). Essa substância mostra uma potência 20 vezes maior na inibição da COX-2

sobre a COX-1 e exibe inibição tempo-dependente (Standing *et al*, 2011).

Apesar da inibição da COX proporcionar a atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética dos AINEs, a simultânea inibição da COX na mucosa do gastrointestinal muitas vezes resulta em úlceras gástricas e intestinais, que podem ter consequências graves. Existem duas isoformas de COX, a COX 1 e a COX 2, que estão expressas de formas diferentes em diferentes tecidos. A COX-1 é expressa na maioria dos tecidos do corpo, incluindo a mucosa do trato gastrointestinal. A COX-2 é expressa em níveis baixos na maioria das células, incluindo o estômago e o intestino humanos, mas a expressão da COX-2 pode ser aumentada em locais que apresentam-se inflamados (Cryer & Feldman, 1998). A ativação da COX 1 resulta na produção de prostaciclina, que quando liberada pelas células endoteliais possui atividade antitrombótica e quando liberada pela mucosa gástrica possui ação protetora. A COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e citocinas em células migratórias e outras. Portanto, as ações anti-inflamatórias dos AINEs são devido à inibição da COX-2, enquanto os efeitos colaterais indesejados, tais como irritação da mucosa gástrica, são devido à inibição da COX-1 (Vane & Botting, 1998).

1.5. EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A carragenina é um mucopolissacarídeo derivado de algas marinhas denominadas *Chondrus*, que causa uma inflamação do tipo adaptativa, não produz efeitos sistêmicos e proporciona alto grau de reprodutibilidade (Boleta-Ceranto *et al*, 2005). Ela proporciona uma inflamação aguda e altamente reprodutível. Sinais cardinais da inflamação, tais como edema, hiperalgesia e eritema desenvolvem-se imediatamente após injeção de carragenina no tecido subcutâneo (Jorge *et al*, 2006).

O edema de pata induzido por carragenina proporciona todos os eventos bioquímicos e celulares, que já foram claramente descritos no passado e constantemente atualizados através de novas descobertas e tem sido cada vez mais usado para testar drogas anti-inflamatórias assim como para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação (Posadas *et al*, 2004). É um modelo útil para avaliar a contribuição de mediadores presentes nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda (Salvemini *et al*, 1996).

O desenvolvimento de edema na pata de ratos após a injeção de carragenina é descrito como um evento bifásico em que vários mediadores operam em sequência para produzir esta resposta inflamatória. A

fase inicial do edema (0 – 1 h), que não é inibida pela ação de anti-inflamatórios não esteróides como indometacina ou aspirina tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-HT e bradicinina. Em contrapartida, a fase que corresponde ao período de 1 a 6 horas tem sido relacionada com a produção elevada produção de prostaglandinas e atribuída à indução de Ciclooxygenase-2 na pata (Salvemini *et al*, 1996).

A infiltração e a ativação local de neutrófilos também contribuem para esta resposta inflamatória. Outro importante mediador na inflamação aguda e crônica é o óxido nítrico (NO), que é gerado através da oxidação do átomo de nitrogênio terminal guanidino da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase. O NO é um potente vasodilatador. Seu envolvimento durante a resposta inflamatória pode estar relacionado à sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e edema através de alterações no fluxo sanguíneo local. Além disso, tem sido demonstrado que o óxido nítrico aumenta a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias *in vitro* (Salvemini *et al*, 1996).

Por muitos anos o rato tem sido o animal de escolha para o estudo da resposta inflamatória aguda. Ratos e outras espécies de cobaias têm sido usados para estudos imunológicos envolvendo reações inflamatórias (Levy, 1969).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e infiltração celular que levam à formação de edema, como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas e acúmulo de leucócitos no local da inflamação. A indução de edema por carragenina na pata de rato é um teste utilizado para determinar a atividade anti-inflamatória e já foi amplamente caracterizada. Mais recentemente, tem sido demonstrado que a COX-2 atinge expressão máxima 1 hora após injeção de carragenina. O modelo de edema em pata de rato tem sido utilizado com frequência para testar novos medicamentos anti-inflamatórios, bem como para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação. Em 1969, Levy verificou que uma injeção de carragenina a 1% na pata de rato provoca um edema semelhante, com o passar do tempo, para o camundongo, mas menos potente em proporção. Sugishita e cols. (1983) caracterizaram a fase aguda do edema de pata de rato utilizando carragenina a 3%. Em 1987, Henriques e cols. mostraram que a injeção de carragenina na pata de rato induz um edema bifásico. A primeira fase é caracterizada por um edema de fraca intensidade e sem relação com a dose de carragenina utilizada, enquanto a segunda fase se desenvolve após 24 horas, mostrando um edema mais acentuado, com um efeito máximo entre 48 e 72 horas.

2. JUSTIFICATIVA

Diclofenaco de sódio é um AINE que bloqueia a síntese de prostaglandinas e possui atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Sua ação é exercida através da inibição da síntese de prostaglandinas, que é conseguida através da inibição da ciclooxigenase (COX). Porém, a simultânea inibição da COX na mucosa gastrointestinal muitas vezes resulta em úlceras gástricas e intestinais, que podem ter consequências graves. Estudos anteriores demonstraram que doses subefetivas de sildenafil aumentaram a atividade antinociceptiva de doses subefetivas de diclofenaco. Considerando que o diclofenaco e o sildenafil são drogas com confirmação de segurança já definidas através de ensaios clínicos e possuem apresentações comerciais, a caracterização de uma atividade anti-inflamatória potenciada com a associação das duas substâncias, contribuirá para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica com provavelmente menores efeitos colaterais associados ao uso de anti-inflamatórios não esteróides.

Asomoza-Espinosa e cols. (2001) demonstraram que doses de sildenafil (25-100 µg) que se mostraram subefetivas quando utilizadas isoladas aumentaram a atividade antinociceptiva de doses subefetivas de diclofenaco (25 µg). Yoon e cols. (2009) verificaram que sildenafil intratecal inibiu a nocicepção induzida por formalina. Apesar de estar bem demonstrado que ao menos parte do efeito hiponociceptivo do diclofenaco pode ser mediado pelo NO/GMPc e potenciado por inibidores da fosfodiesterase, não se sabe se seu efeito anti-edematogênico pode ser influenciado da mesma forma.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da associação de diclofenaco com sildenafil no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma curva dose-resposta para o diclofenaco de sódio e do sildenafil separadamente.

Verificar qual o efeito do sildenafil associado ao diclofenaco de sódio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas, com 3 meses de idade, com peso entre 190 e 250g. Os animais foram criados no Biotério do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB-UFSC), mantidos em gaiolas plásticas, em número de 06 por gaiola, em ambiente controlado a uma temperatura de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade entre 60-80%, ciclo claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial *ad libitum*. Todas as manipulações foram feitas entre 8:00 e 17:00h. O presente estudo seguiu as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América (NIH *Publication* No. 85-23, revisado em 1996). Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA-UFSC/PP00499).

4.2. DROGAS E REAGENTES

Para o tratamento dos animais, utilizou-se diclofenaco de sódio (Galena, Brasil) e sildenafil (Pfizer, UK) diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). O edema foi induzido com carragenina (BDH Chemical, UK) diluída em solução salina (NaCl 0,9%).

4.3. MODELOS EXPERIMENTAIS

4.3.1. Verificação do efeito anti-edematogênico

A verificação do efeito anti-edematogênico foi realizada através do modelo do edema em pata de rato. Este modelo de edema foi induzido pela carragenina. A reação à carragenina é dependente do tempo no qual o volume máximo de edema é conseguido entre três e quatro horas após a aplicação.

Para verificar a influência do sildenafil sobre o diclofenaco, primeiramente, foram administradas doses crescentes de sildenafil (0,01; 0,1 e 1,0 mg/Kg) e diclofenaco (0,5; 2,5 e 5,0 mg/Kg) separadamente a grupos de seis animais. Posteriormente, foi administrado sildenafil e diclofenaco nas doses de 0,01 mg/Kg e 0,25 mg/Kg respectivamente. Cada grupo com seis animais recebeu uma hora antes da injeção subcu-

tânea (s.c.) intraplantar do estímulo inflamatório (carragenina) a dose referente a cada dose testada, diluída com um volume de 0,5 ml intraperitoneal (i.p.), sendo que o grupo controle recebeu solução salina 0,9%. Uma hora após a administração das drogas testadas, 0,1 ml de carragenina a 1% foi injetada via subcutânea na pata direita de cada animal, como mostra a Figura 1. Para avaliação do edema de pata, foi utilizada uma cubeta com água colocada sobre uma balança eletrônica de precisão. A pata direita do animal recebeu uma marcação com caneta azul na articulação tíbio-tarsal para que o nível de imersão da pata no aparelho de avaliação de volume seja uniforme, como mostram as Figuras 2 e 3. Este volume foi aferido, a cada hora, durante quatro horas.

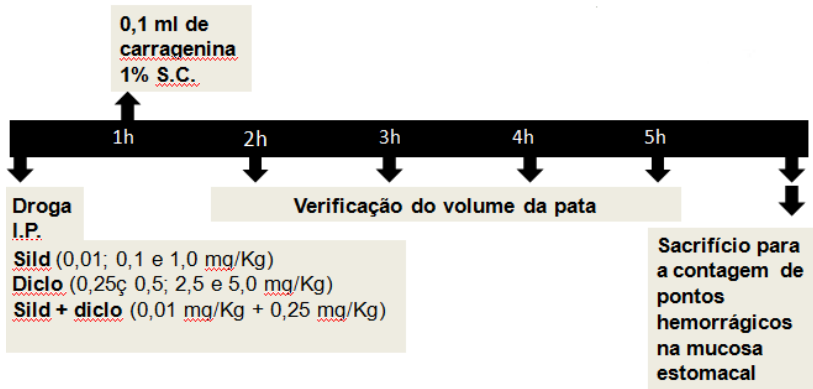


Figura 1: Esquema dos procedimentos realizados durante o protocolo experimental.



Figura 2: Imersão da pata do animal para verificação do volume do edema.



Figura 3: Esquema da imersão da pata do animal para verificação do volume do edema.

4.3.2. Avaliação da toxicidade

O potencial em causar erosão gástrica do diclofenaco e de sua associação com o sildenafil foi avaliado pela contagem de pontos hemorrágicos na mucosa estomacal.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos na verificação do edema em pata de rato foi realizada por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunet. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico GraphPadPrism 5.

5. RESULTADOS

5.1. CURVA DOSE-RESPOSTA DO DICLOFENACO

A Figura 4 mostra o efeito da administração das doses de 0,5 ; 2,5 e 5,0 mg/Kg de diclofenaco, além de solução salina como controle. Nella, pode-se observar que no grupo controle (salina) o edema na pata causado pela administração de carragenina aumentou durante as 4 horas de observação.

A administração de doses crescentes de diclofenaco uma hora após a administração de carragenina apresentou perfis de diminuição do edema diferentes nas doses de diclofenaco utilizadas. A maior dose, 5,0 mg/Kg, apresentou início da diminuição do edema após a segunda hora e manteve sua ação até a quarta hora de experimento. As doses de 2,5 mg/Kg e 0,5 mg/Kg de diclofenaco também apresentaram início da diminuição do edema após a segunda hora, porém, a diminuição do edema mostrou-se mais efetiva entre a quarta e quinta horas de experimento. Na quarta hora de experimento o edema apresentava-se mais diminuído na maior dose (5,0 mg/Kg) do que nas duas menores doses (0,5 mg/Kg e 2,5 mg/Kg).

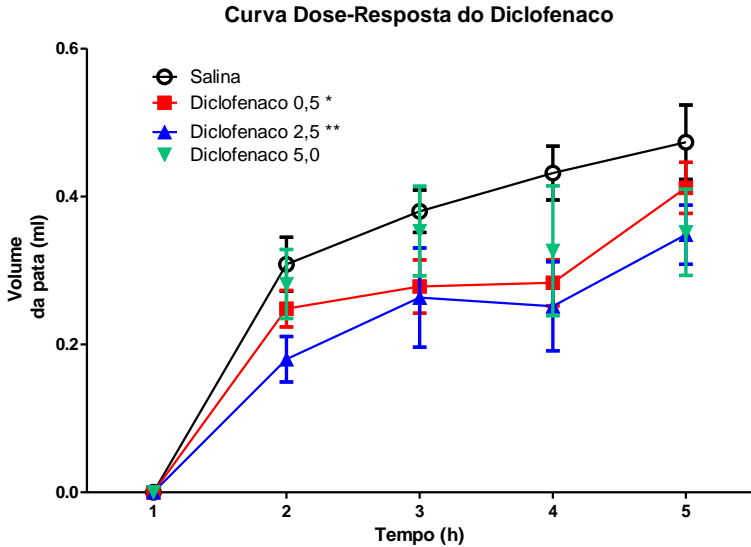


Figura 4: Efeito da administração de doses crescentes de diclofenaco (0,5; 2,5 e 5,0 mg/Kg i.p.) ou solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas.

5.2. CURVA DOSE-RESPOSTA DO SILDENAFIL

A Figura 5 mostra o efeito da administração das doses de 0,01 mg/Kg e 1,0 mg/Kg de sildenafil, além de solução salina como controle.

O grupo controle apresentou durante as cinco horas de observação um edema de volume constante, enquanto as doses crescentes de sildenafil causaram aumento do edema durante as cinco horas de observação. A maior dose, 1,0 mg/Kg, apresentou aumento do volume da pata, caracterizando aumento do edema, até a terceira hora de observação. Entre a terceira e quarta hora, houve diminuição do edema. As doses de 0,1 mg/Kg e 0,01 mg/Kg de sildenafil mostraram aumento do volume da pata durante todo o tempo de observação.

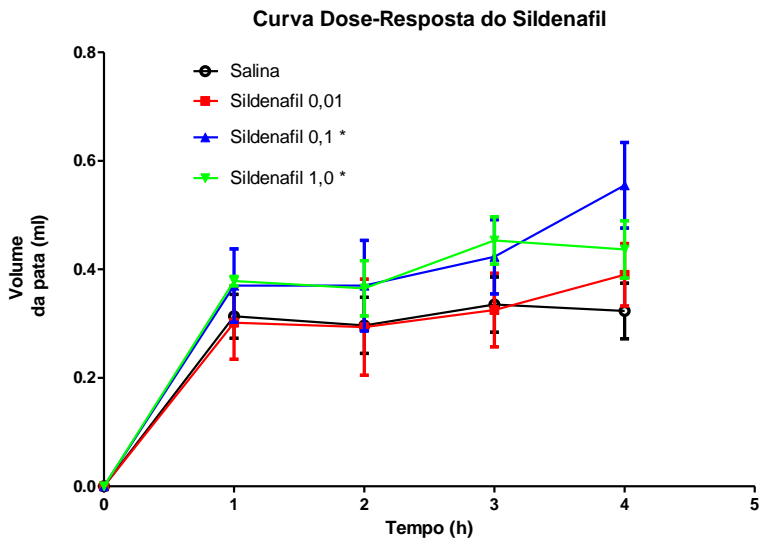


Figura 5: Efeito da administração de doses crescentes de sildenafil (0,01; 0,1 e 1,0 mg/Kg i.p.) ou solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas.

5.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO DICLOFENACO ASSOCIADO AO SILDENAFIL

A administração das doses de 0,25 mg/Kg de diclofenaco e 0,01 mg/Kg de sildenafil associadas apresentou resultado semelhante ao controle, ou seja, o edema induzido por carragenina aumentou durante as cinco horas de observação, na mesma intensidade que o edema apresentado pelo controle, como mostra a Figura 6. A administração de 0,01 mg/Kg de sildenafil sozinho apresentou resultado semelhante à associação com diclofenaco, apresentando aumento do volume da pata durante o experimento, caracterizando aumento do edema.

As doses de 0,25 mg/Kg e 5,0 mg/Kg de diclofenaco sozinhas inibiram o edema, quando comparados com o controle, porém, o sildenafil e associação com diclofenaco (0,25 mg/Kg de diclofenaco e 0,01 mg/Kg de sildenafil) preveniu seu efeito anti-edematogênico durante as quatro horas de observação.

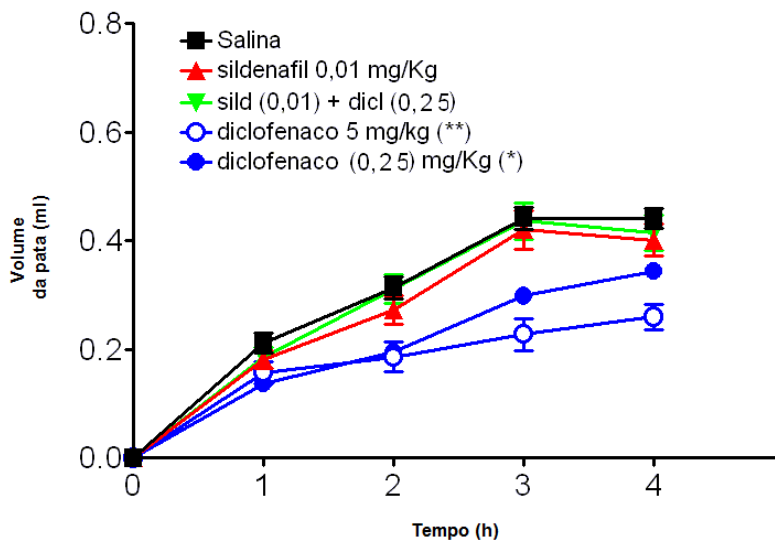


Figura 6: Efeito da administração de diclofenaco e sildenafil associados (0,25 mg/Kg de diclofenaco + 0,01 mg /Kg de sildenafil i.p.), a dose de 0,01mg/Kg de sildenafil, 0,25 mg/Kg e 5,0 mg/Kg de diclofenaco e solução salina no edema em pata induzido por carragenina durante 4 horas.

5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Após a retirada dos estômagos dos animais utilizados, verificou-se que não houve aparecimento de petéquias após as quatro horas de experimento em nenhuma das doses utilizadas. Na Figura 7, vemos que a maior dose de diclofenaco, 5,0 mg/Kg não apresentou petéquias, assim como o controle, na Figura 8.



Figura 7: Estômago após administração de 5 mg/Kg de diclofenaco de sódio.



Figura 8: Estômago de um animal do grupo controle, após administração de salina.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o efeito do agente vasodilatador sildenafilafil, com mecanismo específico reconhecido como inibidor da degradação do GMPc, e sua associação com o agente anti-inflamatório tradicional diclofenaco, sobre o modelo de edema inflamatório induzido por carragenina em ratos. Os principais achados foram que o sildenafil reverte o efeito anti-edematogênico produzido pelo diclofenaco.

Em nosso estudo, o diclofenaco sozinho teve ação anti-edematogênica, em todas as doses testadas, porém a resposta observada não foi sempre diretamente proporcional à dose aplicada. O edema de pata induzido por carragenina é um modelo útil para avaliar o potencial anti-inflamatório das drogas e a contribuição de mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda (Salvemini *et al*, 1996). Apesar de este modelo ser eficaz para detectar o efeito anti-edematogênico de substâncias que inibem a síntese de prostaglandinas, não quer dizer que este modelo seja capaz de expressar claramente uma relação dose-resposta da substância avaliada. Principalmente porque a administração sistêmica de substâncias envolve muitas variáveis farmacocinéticas. Por exemplo, estudos farmacocinéticos demonstraram que a absorção sistêmica do diclofenaco é diretamente proporcional à dose, ou seja, apresenta uma farmacocinética linear (Hinz *et al*, 2005). Porém, estudos clínicos realizados em adultos que fazem tratamento de dor pós cirúrgica mostraram que comprimidos dispersíveis de 25 mg de diclofenaco possuem a metade da eficácia de comprimidos dispersíveis de 50 mg, enquanto comprimidos dispersíveis de 100 mg de diclofenaco são igualmente eficazes aos de 50 mg (McQuay & Moore, 1998). Ou seja, se o aumento da ação relacionado ao aumento da dose é linear somente até a dose de 50 mg em adultos para o tratamento da dor pós-operatória, para a diminuição do edema em pata induzido por carragenina o diclofenaco também pode possuir uma linearidade limitada.

A inflamação induzida por carragenina é aguda e auto-limitada, resolvendo-se sozinha. De fato, o edema causado pela carragenina apresenta volume máximo entre 3 e 4 horas após aplicação subcutânea, diminuindo gradativamente nas horas seguintes. Essas reações são resultantes da ação de mediadores que podem ser gerados no local da inflamação ou trazidos por células que infiltram dos vasos, devido ao edema e aumento da permeabilidade vascular (Jorge *et al*, 2006). Neste modelo, o edema formado durante a primeira hora é devido à liberação de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e bradicinina, sendo que os efei-

tos vasodilatadores da histamina e da bradicinina, envolvem a síntese de óxido nítrico (NO). A partir da primeira hora até a sexta hora após a aplicação de carragenina intraplantar, acontece a indução de COX-2 com liberação de prostaglandinas (Posadas *et al*, 2004), e esta potencia os efeitos vasculares da histamina, 5-HT e bradicinina. Os AINES, como o diclofenaco, agem através da inibição da ciclooxigenase (COX), levando a uma diminuição na síntese de prostaglandinas, e sempre inibem o edema induzido pela carragenina.

Por outro lado, a administração de sildenafil mostrou um potente efeito pró-edematogênico. O sildenafil, mesmo em pequenas doses foi capaz de aumentar o edema gerado pela carragenina. De fato, este efeito não surpreende. O sildenafil atua como vasodilatador da musculatura lisa, pois diminui a degradação do GMPc celular, que é responsável pelo relaxamento das miofibrilas das células musculares lisas. O NO é um potente vasodilatador, o seu envolvimento durante a resposta inflamatória pode estar relacionado à sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e edema através de alterações no fluxo sanguíneo local (Moncada & Higgs, 1991). A ativação da enzima guanilato ciclase, com o consequente aumento da produção de GMPc medeia a maioria dos efeitos fisiológicos relacionados ao NO, e este como citado acima, é induzido por vários mediadores do processo inflamatório, como a histamina e a bradicinina. Dessa forma, o sildenafil, através do aumento de GMPc estaria favorecendo a ação vasodilatadora do NO, potenciando o edema causado pela carragenina. Por vezes, o sildenafil sozinho apresentou efeito antinociceptivo. Estudos prévios mostraram que o tratamento com sildenafil (5mg/Kg) injetado i.p. 5 minutos antes da injeção de uma solução de ácido acético 0,6% (v/v) inibiu significativamente as contorções em camundongos, sugerindo resposta antinociceptiva. Esta resposta é atribuída ao aumento do nível de GMPc causado pelo sildenafil (Bezerra *et al*, 2008).

A principal justificativa para este estudo baseou-se nas muitas evidências de que a produção de GMPc induzido por óxido nítrico contribui para o efeito antinociceptivo do diclofenaco, sugerindo assim que associação deste antiinflamatório com sildenafil aumentaria seus efeitos terapêuticos. Por vezes, a literatura mostra que o sildenafil sozinho apresentou efeito antinociceptivo. Estudos prévios mostraram que o tratamento com sildenafil (5mg/Kg) injetado i.p. 5 minutos antes da injeção de uma solução de ácido acético 0,6% (v/v) inibiu significativamente as contorções em camundongos, sugerindo resposta antinociceptiva. Esta resposta é atribuída ao aumento do nível de GMPc causado pelo sildenafil (Bezerra *et al*, 2008).

Também foi verificada a ação de doses não eficazes de sildenafil com doses não eficazes de agentes adrenérgicos (propranolol, prazosina, atenolol e clonidina) que resultou em significativa inibição da resposta nociceptiva em teste de contorção induzido por ácido acético em camundongos. Este efeito não é devido à interação medicamentosa metabólica, visto que o sildenafil é metabolizado principalmente pelas enzimas do citocromo P 450 e agentes adrenérgicos não são considerados inibidores desta enzima (Bezerra *et al*, 2008). Porém, o mais importante foi que doses subefetivas de sildenafil (25-□□□□g) aumentaram a atividade antinociceptiva de doses subefetivas de diclofenaco (25 □g), aplicado diretamente na pata do animal (Asomoza-Espinosa e cols., 2001).

Dados da literatura sustentam que o mecanismo antinociceptivo do diclofenaco mostrou-se potenciado pelo sildenafil. Diferentemente, no presente estudo, pois mesmo a dose subefetiva do sildenafil foi capaz de bloquear totalmente o efeito anti-edematogênico do diclofenaco. Isto sugere que mesmo não potenciando os vasodilatadores normalmente liberados no processo inflamatório, um possível aumento no GMPc poderia estar estimulando a função de ciclooxigenases, diminuindo a ação do diclofenaco sobre elas. Infelizmente, o efeito potenciador do NO sobre COX, já reportado (Salvemini *et al*, 1996), não parece ser via GC/GMPc (Masuda *et al*, 2010). De qualquer forma, estes resultados sugerem que uma possível combinação de diclofenaco com sildenafil, para se obter melhor efeito analgésico na clínica poderia resultar também na redução de seu efeito anti-edematogênico.

Outro ponto a ser destacado é que o aumento da atividade antinociceptiva do diclofenaco pelo sildenafil (Asomoza-Espinosa e cols., 2001) foi verificada com aplicação das drogas diretamente na pata do animal, diferente do presente estudo, em que utilizamos a via i.p. para aplicação do diclofenaco e do sildenafil, o que se assemelha mais a maneira como os medicamentos são utilizados clinicamente.

Apesar de sildenafil piorar o quadro edematogênico induzido pela carragenina na pata, o exame visual das mucosas estomacais não apontou nenhum efeito pró-erosivo na combinação com o diclofenaco. Como o próprio diclofenaco não produziu pontos hemorrágicos na mucosa estomacal, mesmo na maior dose, não é possível saber se o sildenafil estaria de fato protegendo a mucosa. Isto pode ter acontecido pelo fato de o animal ter recebido somente uma dose de diclofenaco. Porém, Santos e cols. (2005) demonstraram que o sildenafil oferece proteção na mucosa gástrica de ratos tratados com indometacina. Nesse estudo mostrou-se que a proteção causada pelo sildenafil é dose-dependente. Ele foi

capaz de reduzir o dano gástrico causado pela indometacina. Interessantemente, o inibidor da óxido-nítrico sintase (L-NAME) reverteu as propriedades efetivas do sildenafil, de forma dose-dependente. O efeito da L-NAME foi evitado quando foi co-administrado L-arginina, precursor do NO. O aumento da adesão de leucócitos nas vênulas foi também diminuído pelo sildenafil. Esta ação foi inibida quando foi coadministrado L-NAME (Santos *et al*, 2005).

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem uma diferença no perfil de ação do sildenafil sobre o edema de pata induzido por carragenina e em modelos de nocicepção. No presente estudo, o sildenafil mostrou-se pró-edematogênico quando utilizado sozinho ou associado ao diclofenaco, enquanto outros experimentos utilizando outros modelos e associações mostraram um efeito antinociceptivo. Este trabalho acrescenta um elemento importante de conhecimento no processo de se entender como a via NO/GC/GMPc pode contribuir para o controle da dor, ao mostrar uma possível e importante limitação. Naturalmente, estudos semelhantes em outros modelos inflamatórios devem ser realizados para se confirmar se esta associação de substâncias vai se comportar sempre dessa maneira. Nesse caso, os benefícios antinociceptivos de se potenciar a via NO/GMPc seriam limitados pelo agravamento do edema inflamatório e o quanto isso seria problemático para a doença subjacente. Paralelamente, este estudo sugere que o uso do sildenafil pode comprometer uma terapêutica anti-inflamatória em curso. Contudo, para complementar este trabalho, outros inibidores de fosfodiesterase específica e anti-inflamatórios devem ser testados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASOMOSA-ESPINOSA, R.; LÓPEZ, R. A.; ZECUAT, T. M.; BAÑUELOS, P. A.; LÓPEZ, J. E. T.; SOTO, V. G. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*. v. 418, n. 3, p. 195-00. 2001.

BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; GIRÃO, V. V. C.; TEIXEIRA, R. C.; GRAÇA, J. R. V. Antinociceptive activity of sildenafil and adrenergic agents in the writhing test in mice. **Pharmacological Reports**. v. 60, p. 339-44. 2008.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**. v. 20, n. 50, p. 354-60. 2005.

CRANSHAW, J. H.; GRIFFITHS, M. J. D. Inflammatory process in the acute respiratory distress syndrome. **Curr. Anesthesia Crit Care**. v. 14, p. 66-73, 2003.

CRYER, M. D C.; FELDMAN, M. D. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Am. J. Med.** v. 104, n. 5, p. 413-21. 1998.

DUNKEM, T. R.; HATZEMANN, A. The effect of sildenafil in human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. **Cellular Signalling**. v. 17, n. 3, p. 331-9. 2005.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP /Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**. v. 18, n. 2, p. 179-90. 1997.

FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of systemic, spinal and supraspinal -arginine-nitric oxide-cyclicGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**. v. 38, n. 6, p. 835-842. 1999.

GAN, T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Curr Med Res Opin**, v. 26, n. 7, p. 1715-31. 2010.

GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; GOMES-LOPES, L.D.; Ferreira, S.H. Evidence for the involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.** v. 287, p. 281-84. 1997.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 20, p. 243-49. 1987.

HINZ, B.; CHEVTS, J.; RENNER, B.; WUTTKE, H.; RAU, T.; SCHMIDT, A.; SZELENI, I.; BRUNE, K.; WERNER, U. Bioavailability of diclofenac potassium at low doses. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v. 59, n. 1, p. 80-4. 2005.

ISLAS-CADENA, M.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.** v. 42, p. 87-92. 1999.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences.** v. 8, p. 801-08. 1969.

LEVY, J. H. The human inflammatory response. **Cardiovasc. Pharmacol.** v. 27, n. 1, p. 31-37. 1996.

JORGE, S.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; TAMBELLI, C. Interferential therapy produces antinociception during application in various models of inflammatory pain. **Physical Therapy.** v. 86, n. 6, p. 800-08. 2006.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.** v. 87, n. 1, p. 03-11. 2001.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to

dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Res.** v. 45, p. 308-11. 1996.

McQUAY, H. J.; MOORE, R. A. Postoperative analgesia and vomiting, with special reference to Day-case surgery: a systematic review. **Health Technology Assessment.** v. 2, n. 12, p. 81-94. 1998.

MOLLINEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunol. Today.** v. 20, n. 12, p. 535-537. 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 21, p. 361-74. 1991.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.** v. 142, p. 331-38. 2004.

SANTOS, C. L.; SOUZA, M. H. L. P.; GOMES, A. S.; LEMOS, H. P.; SANTOS, A. A. CUNHA, F. Q.; WALLACE, J. L. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. **Br. J. Pharmacol.** v. 146, p. 481-86. 2005.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P.S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G.; Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v. 118, p. 829-38. 1996.

SOUZA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brains Res.** v. 897, p. 9-19. 2001.

STANDING, J. F.; TIBBOEL, D.; KORPELA, R.; OLKKOLA, K. T. Diclofenac pharmacokinetic meta-analysis and dose recommendations for surgical pain in children aged 1-12 years. **Pediatric Anesthesia.** v. 21, p. 316-24. 2011.

SUGISHITA, W.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J. Pharmacobiodyn.** v. 8, p. 565-75. 1993.

TAO, Y. X.; HASSAN, A.; HADDAD, E. JOHNS, R. A. Expression and action of cyclic GMP-dependent protein kinase 1alpha in inflammatory hyperalgesia in rat spinal cord. **Neuroscience.** v. 95, n. 2, p. 525-33. 2000.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.** v. 251, n. 2-3, p. 173-79. 1994.

_____. FERREIRA, S. H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.** v. 326, n. 1, p. 61-65. 1997.

UTHAYATHAS, S.; KARUPPAGOUNDER, S. S.; THRASH, B. M.; PARAMESHWARAN, K.; SUPPIRAMANIAM, V.; DHANASEKARAN, M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacol. Rep.** v. 59, n. 2, p. 150-63. 2007.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.** v. 104, n. 3, p. 2S-8S. 1998.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.** v. 83, n. 3, p. 835-70. 2003.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 111, p. 554-7. 1962.

YOON, M. H.; KIM, C. M.; LEE, H. G.; KIM, W. M.; NA, T. H.; KIM, W. O.; HUANG, L. J.; Synergistic antinociception of intrathecal sildenafil with clonidine in the rat formalin test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 92, p. 583-88. 2009.