

In vivo methods for the evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential

Métodos in vivo para avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo

Silvio de Almeida Junior¹

DOI 10.5935/2595-0118.20190070

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The constant search for bioactive compounds with anti-inflammatory and antinociceptive activities are of interest to research centers. For the characterization of these activities, trials on guinea pigs are necessary. Therefore, the purpose of this study was to demonstrate some methods to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive potential of natural products.

CONTENTS: A stimulus is required to evaluate these activities, and the induction of inflammatory or nociceptive process can be by chemical inducers like formaldehyde, carrageenan, among others, or electronic equipment such as the hot plate. For all assays, the baseline and post-dose measurement of the studied compound is always compared with a control group. The planning of the experiment, as well as its conduct in accordance with well-established protocols, are important tools in the success of the work. The tests presented evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory activity as well as the mechanisms involved.

CONCLUSION: It was possible to evaluate that the tests present in the literature today meet the researcher's need for the elucidation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of new compounds.

Keywords: Abdominal contortion, Formalin, Hot plate, Paw edema.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A busca constante por compostos bioativos com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva são de interesse dos centros de pesquisas. Para a caracterização dessas atividades são necessários ensaios em cobaias. Frente a isso, o objetivo deste estudo foi demonstrar alguns métodos para a avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de produtos naturais.

Silvio de Almeida Junior - <https://orcid.org/0000-0002-7949-4941>.

1. Universidade de Franca, Laboratório de Ciência Animal, Franca, SP, Brasil.

Apresentado em 18 de março de 2019.

Aceito para publicação em 25 de junho de 2019.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Endereço para correspondência:

Avenida Dr. Armando Salles de Oliveira, 201 - Parque Universitário

14404-600 Franca, SP, Brasil.

E-mail: silvioalmeidajr@yahoo.com.br

© Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

CONTEÚDO: Para a avaliação dessas atividades é necessário um estímulo, sendo que a indução de processo inflamatório ou nociceptivo pode ser por indutores químicos como formol, carragenina, entre outros, ou ainda, equipamentos eletrônicos como placa quente. Para todos os ensaios, sempre é realizada a mensuração basal e posterior à administração do composto que está sendo estudado em comparação com um grupo controle. O planejamento do experimento, assim como toda a condução conforme protocolos já bem ilustrados, são ferramentas importantes no êxito do trabalho. Os testes apresentados avaliaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória assim como mecanismos envolvidos.

CONCLUSÃO: Foi possível avaliar que os testes presentes na literatura hoje, atendem a necessidade do pesquisador na elucidação da atividade anti-inflamatória e atividade antinociceptiva de novos compostos.

Descritores: Contorção abdominal, Edema de pata, Formalina, Placa quente.

INTRODUÇÃO

Para o auxílio da manutenção da saúde humana são consumidos, diariamente ao redor do mundo, produtos naturais que apresentam atividades biológicas, uma antiga tradição trazida como herança há milênios. A partir do conhecimento popular se faz necessária a investigação científica da eficácia desses produtos¹. Dentre a diversidade de produtos naturais encontrados, apenas uma pequena porção tem suas caracterizações fitoquímica e potencial biológico investigados. As etapas para esclarecimentos, como isolamento, identificação e obtenção de análogos estruturais do metabólito ativo, associado ao conhecimento do potencial farmacológico, toxicológico e do mecanismo de ação dessas substâncias são fundamentais para a obtenção e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos^{2,3}. A seleção de compostos ativos, presentes em produtos naturais, é um grande desafio enfrentado por pesquisadores, assim como a elucidação de mecanismos de ação desses compostos. Para a realização das descobertas, se faz necessária a realização de ensaios biológicos, que devem ser escolhidos com cautela, visto que precisam ter acuidade na detecção do efeito específico, possuir sensibilidade e reprodutibilidade⁴. É notória a quantidade de pesquisas realizadas em busca de compostos que sejam efetivos para a aplicação como agente anti-inflamatório ou com atividade antinociceptiva e que tragam benefícios com o menor número possível de efeitos adversos causados por sua utilização. Para a boa condução dos experimentos, se faz necessário o estudo prévio das metodologias que serão aplicadas, assim como as doses testadas e quantidade de animais. Um dos testes mais utilizados para

a avaliação antinociceptiva é o teste de formalina. Encontrou-se 395 artigos publicados, e a atividade anti-inflamatória é o edema de pata, com 244 artigos, conforme evidenciado em consulta à base de dados Pubmed, no ano de 2018 (até outubro).

Frente ao relatado, o objetivo deste estudo foi abordar temas referentes aos principais métodos *in vivo* para a avaliação de novos compostos com potencial anti-inflamatório e antinociceptivo, assim como os mecanismos envolvidos.

CONTEÚDO

Devido ao índice de rejeição dos fármacos disponíveis no mercado pelos efeitos adversos, se faz necessário o estudo de novos compostos com atividades efetivas. Dentro da etnobotânica é necessária a avaliação dessas atividades, visto que o número de publicações é crescente dentro dessa área. A seleção dos compostos promissores dentro das atividades anti-inflamatórias e analgésicas inicia-se pela cultura da medicina popular seguida de avaliação química desses produtos naturais. A literatura atribui compostos tais como alcalóides, óleos essenciais, flavonóides, taninos, saponinas e compostos fenólicos como responsáveis pela atividade anti-inflamatória e analgésica esperada, com maior efeito que os fármacos encontrados no mercado^{5,6}. Para comprovação dessas atividades, se faz necessário o uso de modelos animais conforme protocolos, sempre respeitando os princípios éticos. Todos os procedimentos devem passar por comitê próprio, responsável pela avaliação antes do início dos experimentos. Outra observação importante é a utilização do menor número possível de animais, aplicação correta das técnicas e o mínimo de sofrimento causado ao animal^{7,8}.

Seleção de animais

Animais como camundongos (*Mus musculus*) com peso, em média, de 30±5g e ratos (*Rattus norvegicus*) com peso médio de 150±20g são utilizados como modelo nos ensaios *in vivo*. A escolha do modelo animal é baseada no teste realizado e no resultado esperado. Aconselha-se a sua aclimação por um período de sete dias, em condições controladas de temperatura (25±3° C) e ciclo claro/escuro (12h) com alimento e água à vontade⁹.

Testes de contorções induzidas por ácido acético¹⁰

O teste de contorção abdominal em camundongos é um método muito utilizado para avaliar a atividade analgésica de substâncias contra a dor de origem inflamatória, onde o ácido acético (AA) na concentração de 0,6% (0,1mL/10g do animal) induz lesões no abdômen do camundongo, o que é suficiente para provocar os espasmos traduzidos como contorções. Para a realização do teste é necessário a aplicação do composto testado, nas concentrações já pré-definidas. Após 60 minutos, realizar a injeção peritoneal de AA e colocar o animal em caixa de acrílico para que seja possível a observação da quantidade de contrações realizadas em um período de 20 minutos¹¹.

Avaliação da atividade analgésica e/ou anti-inflamatória pelo teste de formalina¹²

O teste de formalina é um teste realizado para a avaliação de analgesia, que consiste na avaliação do processo inflamatório em dois

momentos: a chamada fase neurogênica e a inflamatória. O teste é realizado com camundongos que recebem o tratamento 1h antes do início do teste, junto com controle negativo (veículo), e o controle positivo por via intraperitoneal (geralmente morfina, 2,5mg/kg p.c., i.p. administrada 40 minutos antes da análise). O teste se inicia com a aplicação de 20µL de formalina a 2,5% por via intraplantar na região do membro pélvico posterior direito e cronometrado o tempo que o animal lambe, sacode ou morde a pata injetada com formalina. Usa-se de 0 a 5 minutos para avaliar a sensibilidade dolorosa na fase chamada neurogênica, na qual ocorre a ativação direta de nociceptores pelo agente químico. Depois, 15-30 minutos para determinar a sensibilidade dolorosa na fase chamada de dor inflamatória, que envolve a transmissão sináptica reforçada pela medula espinhal, bem como a liberação dos mediadores locais, tais como prostaglandinas e histaminas¹³.

Dor orofacial induzida por formalina. Adaptado¹⁴

O teste de dor orofacial induzida por formalina é realizado para a avaliação de analgesia na região de ação do nervo trigêmeo onde a literatura descreve diversas doenças relacionadas, levando a um quadro de dor crônica de leve a intensa. O teste pode ser realizado em ratos ou camundongos e consiste na aplicação de 50µL da substância irritante, no caso a formalina a 2%, na região do coxim direito das vibrissas do animal. A aplicação é realizada por via subcutânea, e o processo de autolimpeza (*grooming*) é avaliado por meio do ato de coçar a região onde foi aplicada a formalina com os membros dianteiros, avaliando quantas vezes o animal realizou o ato de autolimpeza, comparado aos controles^{15,16}.

Ensaio da placa quente¹⁷

O ensaio consiste na exposição do animal à superfície quente, para estímulo térmico, para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais. É um modelo que avalia a atividade antinociceptiva de fármacos opioides, mas outros fármacos com atividade central, tais como sedativos e hipnóticos, mostram atividade nesse modelo experimental¹⁸. A avaliação do desempenho motor tem por objetivo detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinar da atividade antinociceptiva. Portanto, fármacos que promovem relaxamento ou sedação alteram o desempenho motor e podem interferir na resposta, sem serem necessariamente antinociceptivos¹⁹. Para tal, deve-se utilizar uma placa quente, mantida a 55°C, onde o animal será colocado durante o tempo limite de 20s ou até que ele faça a retirada da pata para realizar o ato de lambadura (tempo de latência). As mensurações devem ser realizadas em zero, 30, 60 e 90 minutos após o tratamento. Junto com os grupos tratados, deve-se incluir um grupo com morfina (4,0mg/kg p.c.) como composto referência¹⁷.

Teste de Randall-Selitto²⁰

É utilizado para a avaliação nociceptiva que testa a pressão muscular do gastrocnêmio. Para mensuração de dor é necessária a utilização do analgesímetro (Ugo-Basile, Stoelting, Chicago, IL). Para a realização do teste, os animais, geralmente ratos, são deixados em repouso em uma sala com pouca luz e temperatura controlada para reduzir o nível de estresse. Após 30 minutos, o animal tem o membro pél-

vico inferior colocado no equipamento. Após a alocação do animal, o equipamento inicia a aplicação de pressão em gramas, gradativamente, até que o animal sinta um desconforto, retirando o membro ou vocalizando. O próprio equipamento registra em gramas a pressão suportada. O teste deve ser realizado antes da administração do fármaco testado e nos períodos de 30min, 1, 2, 3 e 4h e comparados com fármacos analgésicos já conhecidos^{21,22}.

Teste de von Frey²³

O teste de von Frey, ou teste de pressão crescente em pata de ratos, consiste na aplicação de uma pressão em gramas nos membros posteriores do rato através de um equipamento eletrônico. Inicialmente, o teste descrito utilizava formas manuais e vem sendo alterado para formas eletrônicas por melhor e maior precisão dos resultados aferidos, entretanto, ainda é possível encontrar trabalhos realizados com equipamentos manuais. O animal é posicionado no equipamento, e através de monofilamentos de ponta rígida de von Frey são aplicados e mensurados em gramas, os limiares de dor mecânica. Esse teste é utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva. O teste é realizado até seis vezes para que seja possível obter uma mensuração de três valores próximos de retirada da pata após a aplicação de pressão linear. O resultado é quantificado como a variação na pressão (D de reação em gramas) obtida, subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (zero hora), da média de três valores em gramas (força), após a administração dos estímulos que variam de acordo com o experimento²⁴.

Teste de retirada da cauda²⁰

É utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva promovida pelo sistema nervoso central e é de simples realização. O animal (rato) é colocado no equipamento e sua cauda repousada sobre um local onde será incidido um feixe de luz que aquecerá a cauda do animal. Um teste basal deve ser realizado, e os animais com tempo de retirada da cauda superior a 7,9s devem ser excluídos. Após a administração do produto natural avaliado, realizar a mensuração no período de 2h (30, 60, 90, 120 minutos)^{19,25}.

Edema intraplantar induzido por carragenina²⁶

A injeção intraplantar de carragenina induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada dos animais. Esse edema, que é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constitui-se em um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória. A carragenina desencadeia o processo inflamatório mediado por prostaglandinas, apresentando pico máximo entre 2 e 3h após a aplicação^{27,28}. A inibição do edema causado por carragenina envolve o mecanismo relacionado com a síntese de prostaglandinas, em especial PGE2 α e PGF2 α , sendo a atividade comparada a anti-inflamatórios não esteroides (AINES)²⁹. Antes da realização do teste, deve ser avaliado o volume do membro pélvico inferior (pata traseira) do animal por meio de plestismometria. A administração deve ser feita em um grupo controle veículo, para avaliar o solvente utilizado na solubilização do composto testado; um grupo controle com um AINE, e os grupos testes com doses já bem definidas. Após 1h da aplicação, deverá ser realizada a aferição do volume em 30, 60, 120 e 180 minutos, pela injeção da pata no plestismômetro^{9,30}. Além da carragenina³¹ que é o mediador pró-inflamatório mais utilizado,

pode-se utilizar a histamina³², dextran³³, xileno e serotonina³⁴, bradicinina e prostaglandina³⁵.

Edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos³⁶

O teste tem como importância a avaliação através da capacidade de inibir a formação do edema na orelha dos animais testados após a aplicação tópica do óleo de cróton. Para a realização desse teste, deve-se administrar, 1h antes, o composto de interesse sobre a superfície interna da orelha. Deve-se decidir qual orelha receberá a indução do processo inflamatório com óleo de cróton e em qual será administrada acetona na mesma quantidade que o óleo para controle negativo. Realizar a mensuração da formação do edema com a aplicação do composto e em acetona. O teste pode ser utilizado ainda, acrescentando um grupo de animais testados com fármacos já conhecidos no mercado, como a indometacina e a dexametasona³⁷.

Peritonite induzida por carragenina³⁸

Através do uso da carragenina é possível produzir uma resposta inflamatória na cavidade peritoneal com predominância de muitas células polimorfonucleares presentes no exsudato. Deve ser realizado o tratamento dos animais com o grupo do veículo utilizado, um grupo com fármaco AINES e os grupos testes com concentrações já bem definidas. Realizar a aplicação de carragenina por injeção intraperitoneal e aguardar 4h para que o animal tenha a ação anti-inflamatória e a formação de exsudato. Após o período aguardado, eutanasiar o animal e lavar o peritônio com solução PSB heparinizado para contagem de células polimorfonucleares. O número de leucócitos deve ser comparado ao grupo teste para análise³⁹.

Pleurisia⁴⁰

No teste da pleurisia é avaliado o efeito anti-inflamatório sistêmico através do volume de exsudato, ou seja, em um processo inflamatório na região pleural, a quantidade de proteínas existentes tende a aumentar e o número de células de defesa (leucócitos) tem um aumento significativo⁴¹. Para a realização deste estudo deve ser feito o tratamento por gavagem dos animais grupo controle, com solução veículo, grupo com fármaco já conhecido e grupo testes com concentração já bem definidas, e após 60min, realizar a indução do processo inflamatório com aplicação de carragenina em injeção na região pleural. Seis horas após a indução do processo inflamatório, deve ser realizada a eutanásia dos animais e abertura da cavidade pleural. Enxaguar com solução fisiológica e EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) e realizar contagem de celulariedade em câmara de Neubauer, comparando sempre ao controle negativo⁴².

CONCLUSÃO

Os benefícios que são alcançados durante esses estudos são inegáveis, porém, princípios éticos devem ser seguidos na utilização do número de animais testados e resultados esperados. A utilização de animais para fins experimentais é de suma importância e cabe ao pesquisador saber escolher os melhores testes que fundamentem as hipóteses e direcione a obtenção de moléculas com potencial analgésico ou anti-inflamatório.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- Karasawa MMG, Mohan C. Fruits as prospective reserves of bioactive compounds: a review. *Nat Prod Bioprospect*. 2018;8(5):335-46.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1582-614.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 2005;78(5):431-41.
- Eliaser EM, Ho JH, Hashim NM, Rukayadi Y, Ee GCL, Razis AFA. Phytochemical constituents and biological activities of melicope lunu-ankenda. *Molecules*. 2018;23(10). pii: E2708.
- Ibrahim N, Wong SK, Mohamed IN, Mohamed N, Chin KY, Ima-Nirwana S, et al. Wound healing properties of selected natural products. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(11). pii: E2360.
- Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from natural products. *Molecules*. 2016;21(5). pii: E559.
- Marques RG, de Miranda ML, Caetano CE, Biondo-Simões Mde L. [Towards a Brazilian regimentation for use of animals in teaching and in scientific research]. *Acta Cir Bras*. 2005;20(3):262-7. Portuguese.
- Zuanon AC, Benjamin LA, Fonseca CC. Contribuições para a adoção de uma cultura de divulgação, valorização e de respeito aos comitês e, ou, comissões de ética no uso de animais. *Rev Ceres, Viçosa*. 2014;61(Suppl):757-63.
- Batista EK, Trindade HI, Lira SR, Muller JB, Silva LL, Batista MC. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. *Rev Bras Pl Med Campinas*. 2016;18(2):433-41.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*. 1959;18:412-6.
- Moreno-Quirós CV, Sánchez-Medina A, Vázquez-Hernández M, Hernández Reyes AG, García-Rodríguez RV. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(11):1047-53.
- Hunskar S, Berge OG, Hole K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain*. 1986;25(1):125-32.
- Callegari DC, Correa JA, Pires OC, Braga RB, Gimbo AF, de Souza AA, et al. [Hyperalgesic effect of subarachnoid administration of phentolamine in mice]. *Rev Bras Anestesiologia*. 2015;65(2):111-6. Portuguese. Erratum in: *Rev Bras Anestesiologia*. 2016;66(1):111-4. Portuguese.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977;4(2):161-74.
- Cazanga V, Hernandez A, Morales B, Pelissier T, Constandil L. Antinociception induced by copper salt revisited: interaction with ketamine in formalin-induced intraplantar and orofacial pain in mice. *J Oral Facial Pain Headache*. 2018;32(3):247-57.
- Magalhães FE, Batista FL, Serpa OF, Moura LF, Lima MD, da Silva AR, et al. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1575-85.
- D'amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1941;72(1):74-9.
- Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol*. 2001;76(1):45-8.
- Singh P, Kongara K, Harding D, Ward N, Dukkkipati VS, Johnson C, et al. Comparison of electroencephalographic changes in response to acute electrical and thermal stimuli with the tail flick and hot plate test in rats administered with opiophin. *BMC Neurol*. 2018;18(1):43.
- Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1957;111(4):409-19.
- Kiso T, Moriyama A, Furutani M, Matsuda R, Funatsu Y. Effects of pregabalin and duloxetine on neurotransmitters in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of fibromyalgia. *Eur J Pharmacol*. 2018;827:117-24.
- Valdes C, Bustos G, Martínez JL, Laurido C. Antinociceptive antibiotics-loaded into solid lipid nanoparticles of prolonged release: measuring pharmacological efficiency and time span on chronic monoarthritis rats. *PLoS One*. 2018;13(4):e0187473.
- Jensen K, Andersen HO, Olesen J, Lindblom U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain*. 1986;25(3):313-23.
- Dutta R, Lunzer MM, Auger JL, Akgün E, Portoghesi PS, Binstadt BA. A bivalent compound targeting CCR5 and the mu opioid receptor treats inflammatory arthritis pain in mice without inducing pharmacologic tolerance. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):154.
- Fatemi I, Amirteimoury M, Shamsizadeh A, Kaeidi A. The effect of metformin on morphine analgesic tolerance and dependence in rats. *Res Pharm Sci*. 2018;13(4):316-23.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-7.
- Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*. 2002;924(2):219-28.
- Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;118(4):829-38.
- Zitterl-Eglsger K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavecz M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol*. 1997;57(2):139-44.
- Sdayria J, Rjeibi I, Feriani A, Ncib S, Bouguerra W, Hfaiedh N, et al. Chemical composition and antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory effects of methanolic extract of *Euphorbia retusa* in mice. *Pain Res Manag*. 2018;2018:4838413.
- Moraes ADTO, Miranda MDS, Jacob FTT, Amorim CADC, Moura RO, Silva SÂSD, et al. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2018;26(20):5388-96.
- Khlebnicova TS, Piven YA, Baranovsky AV, Lakhvich FA, Sorokina IV, Tolstikova TG. Fluorine-containing lupane triterpenoid acid derivatives: design, synthesis and biological evaluation as potential anti-inflammatory agents. *Steroids*. 2019;147:62-9.
- Vysakh A, Jayesh K, Helen LR, Jyothis M, Latha MS. Acute oral toxicity and anti-inflammatory evaluation of methanolic extract of *Rotula aquatica* roots in Wistar rats. *J Ayurveda Integr Med*. 2018;16. [Epub ahead of print].
- Shabbir A, Batool SA, Basheer MI, Shahzad M, Sultana K, Tareen RB, et al. Ziziphora clinopodioides ameliorated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in different models of acute and chronic inflammation. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1710-21.
- Osafo N, Obiri DD, Antwi AO, Yeboah OK. The acute anti-inflammatory action of xylopic acid isolated from *Xylopiopsis aethiopia*. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;29(6):659-69.
- Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, et al. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*. 1986;19(5-6):371-3.
- Januario JP, de Souza TB, Lavorato SN, Maiolini TCS, Domingos OS, Baldim JL, et al. Design and synthesis of new benzophenone derivatives with in vivo anti-inflammatory activity through dual inhibition of edema and neutrophil recruitment. *Molecules*. 2018;23(8). pii: E1859.
- Ferrández ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*. 1991;32(3-4):283-8.
- Sreeja PS, Arunachalam K, Martins DTO, Lima JCDS, Balogun SO, Pavan E, et al. *Sphenodesme involucreta* var. *paniculata* (C.B. Clarke) Munir: chemical characterization, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of methanol extract of leaves. *J Ethnopharmacol*. 2018;225:71-80.
- Ammendola G, Di Rosa M, Sorrentino L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. *Agents Actions*. 1975;5(3):250-5.
- Zanusso-Junior G, Melo JO, Lopes Romero AL, Dantas JA, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) in rodents. *Rev Bras Plantas Med*. 2010;13(1):17-23.
- da Silva Balin P, Zanatta FC, Jorge BC, Leitão M, Kassuya RM, Cardoso CAL, et al. Toxicological evaluation and anti-inflammatory potential of an ethanolic extract from *Bromelia balansae* (Bromeliaceae) fruit. *J Ethnopharmacol*. 2018;222:79-86.

