

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TRATAMENTO ORAL COM O ALCALOIDE  
APORFÍNICO ESTEFALAGINA: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPs

Karen Ramos de Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção do  
Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG  
Dezembro– 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TRATAMENTO ORAL COM O ALCALOIDE  
APORFÍNICO ESTEFALAGINA: ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPs

Karen Ramos de Oliveira

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cássia Regina Silva  
Instituto de Genética e Bioquímica

Coordenador do Curso de Biotecnologia  
Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG  
Dezembro– 2017

*Aos meus pais e minha irmã,  
por me incentivarem e me apoiarem nessa  
jornada acadêmica. Obrigada, amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais uma vitória.

Aos meus pais, Noraldino e Núria, por todo apoio e incentivo nos momentos difíceis em que tive que me esforçar e me dedicar.

À minha irmã, Karla, por ter me incentivado a seguir em frente pra alcançar meus objetivos.

Ao meu namorado, João Kaian, por ter me apoiado e me mostrado nas dificuldades que eu conseguiria vencer meus medos.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Cássia Regina Silva pela oportunidade, dedicação, paciência, e muitos ensinamentos que me engrandeceram.

Aos amigos do laboratório, Kássio, Thiago, e especialmente ao Allisson que tanto me auxiliou nos experimentos e desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas, amigos, e professores da graduação que fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

## RESUMO

Condições dolorosas agudas e crônicas ainda são de difícil tratamento e a busca por novas estratégias terapêuticas a partir do estudo de produtos de origem natural mostra-se como uma boa alternativa, pois são utilizados no tratamento de diversas doenças e são considerados importantes fontes de investigação de novos fármacos. Produtos naturais, entre eles alcaloides, possuem um grande potencial analgésico. Neste sentido, um estudo recente demonstrou que um alcaloide aporfínico apresentava efeitos analgésicos por interagir com Receptores de Potencial Transitório (TRPs), em especial os TRPV1 (vanilóide) e TRPA1 (anquirina). Os canais TRPV1 e TRPA1 são receptores polimodais que respondem a diferentes estímulos, são expressos em células não neuronais e neurônios sensoriais periféricos, e sua ativação está envolvida com a modulação de dor e inflamação. Assim, o presente trabalho avaliou o possível efeito antinociceptivo de um novo alcaloide aporfínico, a estefalagina, isolado da *Annona crassiflora* Mart, e sua possível interação com receptores TRP em camundongos. Para tanto, os animais foram submetidos a uma injeção intra-plantar (20 uL) do agonista TRPV1 capsaicina (1,6 µg), ou do agonista TRPA1 cinamaldeído (1,3 µg), ou de formalina (2,5%), e tratados ou não com a estefalagina (1 mg/kg, via oral, 1 h antes das injeções i.pl.). Os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de respostas nociceptivas (lambida de pata). Além disso, foi realizado um ensaio de influxo de Ca estimulado pela aplicação de capsaicina, em amostras de sinaptossoma de medula espinhal tratados ou não com estefalagina. Foi observado que o tratamento com a estefalagina é capaz de reduzir a nocicepção causada pela administração i.pl. dos agonistas dos receptores TRPA1 e TRPV1, e ainda da formalina. Foi observado ainda que a estefalagina é capaz de reduzir o influxo de Ca<sup>++</sup> induzido pela aplicação de capsaicina. Os resultados sugerem que a estefalagina possa ser promissora para desenvolvimento de novas drogas analgésicas, e sua possível interação com receptores TRP deve ser melhor investigada.

**Palavras- chave:** dor, estefalagina, TRPV1, TRPA1, nocicepção.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Dor.....	9
1.2 TRP.....	12
1.3 Produtos Naturais na Dor .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo Geral .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1 Animais .....	18
3.2 Nocicepção induzida por cinamaldeído.....	18
3.3 Nocicepção induzida por formalina.....	19
3.4 Nocicepção induzida por capsaicina.....	19
3.5 Efeito da estefalagina por influxo de cálcio através da capsaicina .....	20
3.6 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS .....	21
4.1 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor induzida pela injeção de cinamaldeído.....	21
4.2 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor neurogênica e inflamatória induzida pela injeção de formalina .....	22
4.3 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor induzida pela injeção de capsaicina .....	23
4.4 Influxo de cálcio.....	24
5. DISCUSSÃO .....	25
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS .....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alcaloide estefalagina isolado da casca da fruta da <i>A. crassiflora</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Efeitos da administração oral de estefalagina no comportamento da dor induzida em camundongos por administração intraplantar de cinamaldeído. ....	22
<b>Figura 3.</b> Efeitos da administração oral de estefalagina no comportamento de dor induzida em camundongos por administração intraplantar de formalina.....	23
<b>Figura 4.</b> Efeitos da administração oral de estefalagina no comportamento da dor induzida em camundongos por administração intraplantar de capsaicina.....	24
<b>Figura 5. A:</b> Efeitos da administração da estefalagina no influxo de cálcio induzido <i>in vitro</i> com administração de capsaicina. <b>B:</b> Efeito da estefalagina no influxo de cálcio induzido <i>in vitro</i> com administração de capsaicina.....	25

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são tradicionalmente utilizados para o tratamento de doenças e continuam sendo considerados importantes fontes de investigação de novos fármacos em potencial, mostrando-se eficazes no tratamento de condições dolorosas agudas e crônicas. Compostos oriundos de produtos naturais que tem efeito analgésico podem agir por diferentes vias de sinalização, uma via recorrente é a ativação dos Receptores de Potencial Transitório (TRPs) e ainda, produtos naturais tem tido grande destaque na caracterização da família destes canais TRP (CALIXTO et al., 2005).

Os receptores de potencial transitório são encontrados em mamíferos e apresentam 28 proteínas diferentes, que são reunidas de acordo com sua sequência de aminoácidos em 6 famílias, das quais destacamos duas: TRPV (vanilóide) e TRPA (anquirina) (CLAPHAM, 2003; MONTELL; BIRNBAUMER; FLOCKERZI, 2002).

A ativação dos canais TRPV1 ocorre frente a diferentes tipos de estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Exemplos incluem temperaturas nocivas  $\geq 43$ , pH abaixo do fisiológico, e substâncias naturais irritantes como a capsaicina (presente na pimenta) e a resiniferatoxina (oriunda da planta *Euphorbia resinifera*), por exemplo (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; CALIXTO et al., 2005). Estes receptores estão expressos em neurônios sensoriais, onde sua ativação pode levar a liberação de neuropeptídios como a substância P (SP), atuando na indução de processos inflamatórios e de nocicepção (CORTRIGHT et al., 2007; CALIXTO et al., 2005). Já o receptor TRPA1, assim como os TRPV1, também é polimodal e responde a diferentes tipos de estímulos. Este canal é um dos principais sensores para substâncias naturais derivadas de plantas, tendo como exemplo de ativadores o cinamaldeído (presente na canela) e a formalina, em concentrações de até 1% (originada do metanal) (SHIELDS et al., 2010; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005).



Os receptores TRPA1 encontram-se co-localizados com os receptores TRPV1 em uma subpopulação de fibras sensoriais peptidérgicas não mielinizadas ou pouco mielinizadas, chamadas de fibras C, ou de fibras A $\delta$ , respectivamente. Quando expressos em neurônios sensoriais sua ativação confere a estes receptores características importantes em condições inflamatórias, onde a ativação de um canal pode levar à ativação subsequente do outro por mecanismos indiretos que podem envolver vias de sinalização como proteínas quinases, mediadores endógenos, como a bradicinina, e o cálcio (BAUTISTA et al., 2006; PATIL; JESKE; AKOPIAN, 2010).

Nosso grupo tem buscado por novas moléculas bioativas e eficazes no tratamento de condições dolorosas agudas e crônicas. Um exemplo é a planta *Annona crassiflora* Mart., pertencente à família *Annonaceae*, uma espécie nativa do cerrado, popularmente conhecida como araticum. JUSTINO et al. (2016), caracterizou o isolamento e identificou o alcaloide encontrado no extrato da casca da planta. Um estudo recente demonstrou que outro alcaloide aporfínico teve um efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória, e que este efeito ocorria via interações com canais TRP (MONTRUCCHIO et al, 2013). Assim sendo, a hipótese levantada no nosso trabalho é que a estefalagina, um alcaloide aporfínico, possa ter efeitos antinociceptivos via interação de receptores TRPV1 e TRPA1.

## **1.1 Dor**

A dor pode ser descrita como uma sensação temporária e desagradável que ocorre após um estímulo nocivo, que atua na forma de proteção tecidual contra lesões. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é descrita como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um estímulo lesivo ou potencialmente lesivo (SHERRINGTON, 1906). Podemos nos referir a dor como uma experiência, não somente como uma sensação, pois podem ser agregados a essa definição fatores ambientais e componentes sensoriais que possam ter influências pessoais. Já o termo

nocicepção tem como definição somente a sensação, não é levado em consideração fatores emocionais, assim, inclui as vias neuroanatômicas, mecanismos neurológicos e receptores que são específicos para detectar estímulos nocivos. Logo, em animais é avaliada a nocicepção, e não dor (KANDEL et al., 2003).

A dor pode ser classificada como aguda ou crônica, sendo que a dor crônica é a que possui maior impacto na qualidade de vida do indivíduo. A dor aguda é descrita de acordo com a ativação local de nociceptores induzida por um dano tecidual, essa dor pode desaparecer antes mesmo do restabelecimento do tecido lesado. Enquanto isso, a dor crônica proveniente de uma doença ou lesão tecidual, na maioria das vezes ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, isso acarreta sofrimento e incapacidade, podendo ter duração mínima de três meses e maior que seis meses (MILLAN, 2002).

Pouco se sabe sobre a epidemiologia da dor crônica no Brasil e no mundo, principalmente quando se trata de pesquisas de prevalência de dores múltiplas. A dor é considerada um problema de saúde frequente que causa prejuízos econômicos e pessoais à população. A dor crônica foi considerada como um problema de saúde pública pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos (VON KORFF, M., et al., 1990), foi utilizado como exemplo da pesquisa a dor lombar, que é colocada como um problema de alto custo social e médico neste país, onde foi relatado que a cada mil habitantes há, por ano, uma perda de 1400 dias de trabalho (CAVANAUGH, J. M., 1994). Em um estudo realizado no Brasil, dos pacientes que apresentaram dor crônica, 94,9% relataram comprometimento da atividade profissional (TEIXEIRA, M.J, 1995). Além disso, as dores físicas geram sentimentos de incapacidade para a realização de tarefas comuns do cotidiano. Essa incapacidade física e emocional tem afetado homens e mulheres, que passam a manifestar casos depressivos desse desgaste a sofrimento (KRELING, M.C.G.D., et al., 2006).

Após compreender que a dor é causada por estímulos lesivos reais ou em termos de tal dano, Charles Sherrington nomeou a capacidade desses estímulos de causar dor, de “nocivo”. O termo “nociceptor” foi registrado se referindo a fibras aferentes que tem como função detectar o estímulo nocivo (SHERRINGTON, 1906). Somente em meados do século XX foi identificado por Iggo e colaboradores o que seriam as fibras aferentes capazes de responder aos estímulos nocivos (IGGO, 1959; 1960; HUNT E MCINTYRE, 1960). Esses estímulos nocivos podem ser percebidos como térmicos ou químicos, por exemplo, os quais são representados como nociceptivos quando há estimulação dessas fibras aferentes primárias. As fibras C e as fibras A $\delta$  são as duas principais classes de nociceptores, sendo que a fibra C é formada por neurônios não mielinizados e a fibra A $\delta$  por neurônios finamente mielinizados (MEYER et al, 2008).

Podemos dizer que a maioria das fibras C são nociceptores polimodais, ou seja, que reagem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Normalmente, o estímulo nocivo é definido, por exemplo, quando há ativação de fibras C peptidérgicas, essas fibras fazem conexões com neurônios da lâmina I, a lâmina mais externa do corno dorsal da medula. Os corpos neuronais estão localizados na substância cinzenta da medula espinhal, onde a mesma é dividida em lâminas (o corno dorsal é composto pelas seis primeiras lâminas, e nele são encontrados os neurônios que estão envolvidos na modulação da dor). A resposta aos estímulos mecânicos se dá pela ativação das fibras C não peptidérgicas e das fibras A $\delta$ . As fibras A $\delta$  estão relacionadas com as características de resposta a dor rápida ou primária, que é resultado de um estímulo pontual, já as fibras C estão envolvidas na dor lenta (CUELLO et al.,1993; AVERIL et al., 1995; D'MELLO E DICKENSON, 2008; CAVANAUGH et al., 2009; SCHERRER et al., 2009; OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Para o controle da nocicepção são utilizados os analgésicos, que fazem parte de um grupo de medicamentos que diminuem ou interrompem as vias de transmissão nervosa nociceptiva. Dentro das diferentes classes de analgésicos, várias são oriundas de produtos

naturais como, por exemplo, a morfina, que é um alcaloide pertencente ao grupo dos opioides e oriundo da *Papaver somniferum*, que foi descoberto e isolado no início do século XIX.

Nas pesquisas sobre dor, um alvo que vem sendo explorado com frequência são os canais TRP. Estes canais estão expressos em neurônios sensoriais, importantes para a detecção de estímulos nocivos e grande atenção tem sido direcionada a estudos que investiguem seu papel em diferentes patologias dolorosas, agudas e crônicas.

## 1.2 TRP

Os canais TRPs podem ser classificados como sensores polimodais que fazem parte de uma vasta variedade de processos celulares (MONTELL, 2005; MORAN et al., 2011). Existem hoje caracterizados, mais de 50 membros que compõe a família dos TRPs, sendo que esta é considerada uma das maiores famílias que possuem canais iônicos e ampla distribuição filogenética (MINKE, 2010; VRIENS; APPENDINO; NILIUS, 2009).

Outra característica é que a família dos TRPs possuem canais catiônicos não seletivos, esses são constituídos por seis domínios transmembrana tendo suas porções amino e carboxi terminais intracelularmente localizadas (NILIUS et al., 2007). Esses receptores são encontrados em mamíferos e apresentam 28 proteínas diferentes, que são reunidas de acordo com sua sequência de aminoácidos em 6 famílias, das quais destacamos duas: TRPV (vanilóide) e TRPA (anquirina). As demais famílias são: TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina) (CLAPHAM, 2003; MONTELL; BIRNBAUMER; FLOCKERZI, 2002).

Conforme citado anteriormente, os TRPs podem sofrer ativação de uma ampla gama de estímulos nocivos (PEDERSEN et al., 2005; NILIUS et al., 2005). Os receptores das famílias TRPV (1-6) e TRPA (1), especialmente, podem ser ativados por calor, frio, substâncias químicas irritantes e estimulação mecânica (NILIUS et al., 2007).

A ativação dos canais TRPV1 ocorre em resposta a temperaturas elevadas ( $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ), em condições de  $\text{pH} < 5,9$ , e por substâncias naturais irritantes como a capsaicina (presente na pimenta) e a resiníferatoxina (oriunda da planta *Euphorbia resinifera*), por exemplo (CALIXTO et al., 2005). O receptor TRPV1 é caracterizado como um canal iônico não seletivo para cátions, mas possui preferência à cálcio. Esses canais são expressos ainda em neurônios sensoriais periféricos, onde sua ativação pode levar a liberação de neuropeptídios como a SP, atuando na indução de processos inflamatórios e de nocicepção (CORTRIGHT et al., 2007; CALIXTO et al., 2005). Dessa forma, o antagonismo do canal TRPV1 está entre as principais estratégias utilizadas por estudos na atualidade para promover o tratamento de diversas síndromes dolorosas (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; WONG; GAVVA, 2009).

Estudos foram realizados com teste de aplicação de capsaicina na pele de humanos, tendo como resultado que a substância induziu dor em queimação e vasodilatação, mas também foi observado que após o período de dor houve a ocorrência de um período refratário, onde foi observado uma dessensibilização ao estímulo. Portanto, o local onde foi exposto a dor agora tornou-se resistente à aplicação posterior de capsaicina, ou a outros estímulos como calor nocivo ou substâncias químicas, por exemplo. Em animais adultos ou neonatos, o tratamento com capsaicina tem efeito analgésico, pois pode provocar degeneração de fibras sensoriais específicas (de pequeno diâmetro e peptidérgicas) (CALIXTO et al., 2005; SCHUMACHER, 2010). O receptor TRPV1 mostrou-se capaz de integrar vários estímulos químicos e físicos que provocam dor, logo, foi considerado um alvo potencial para o desenvolvimento de analgésicos (SZALLASI et al., 2007).

O único representante da subfamília de receptores TRPA em mamíferos é o TRPA1, que foi isolado pela primeira vez em culturas de fibroblastos de pulmão fetal humano (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999; ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012).

Esses receptores, assim como os TRPV1, são polimodais e respondem a diferentes tipos de estímulos químicos, térmicos e mecânicos. O receptor TRPA1 pode ser ativado em resposta a estímulos mecânicos, frio e por diversas substâncias que são derivadas de produtos naturais, especialmente de plantas, tendo como exemplo de ativadores o cinamaldeído (presente na canela), a formalina, em concentrações de até 1% (originada do metanal) e alicina (presente no alho) (SHIELDS et al., 2010; BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005).

Os receptores TRPA1 encontram-se co-localizados com os receptores TRPV1 em uma subpopulação de fibras sensoriais peptidérgicas não mielinizadas ou pouco mielinizadas, chamadas de fibras C, ou ainda de fibras A $\delta$ . Assim, a ativação destes receptores pode levar ao influxo de Ca<sup>++</sup>, causando a liberação de neuropeptídeos, como a SP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (BASBAUM et al., 2009). Ainda, a sua habilidade de interagir com o receptor TRPV1 quando expressos em neurônios sensoriais confere a estes receptores características importantes em condições inflamatórias, com ativação cruzada por mecanismos indiretos que podem envolver vias de sinalização como proteínas quinases, mediadores endógenos como a bradicinina e o cálcio (BAUTISTA et al., 2006; PATIL; JESKE; AKOPIAN, 2010). Sinais clássicos de inflamação podem ser induzidos pela ativação destas terminações e consequente liberação de neuropeptídeos, levando ao processo de inflamação neurogênica. Essa inflamação ocorre no mecanismo de doenças como dor neuropática, asma, enxaqueca e dermatite (INOUE et al., 1997; PETERS et al., 2006).

Produtos naturais contendo ativadores dos canais TRP tem sido empregados na culinária e uso medicinal ao longo dos anos e estes receptores ainda representam um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos oriundos de compostos naturais.

### 1.3 Produtos Naturais na Dor

Medicamentos de origem natural são bastante utilizados para tratamento de diversas patologias (DA SILVA-JÚNIOR et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2014). Um dos grandes exemplos é a morfina, um fármaco de alto poder analgésico, alcaloide pertencente ao grupo dos opioides e oriundo da *Papaver somniferum* (CALIXTO et al., 2005). Ainda, como outro exemplo tem-se o ácido acetil salicílico, que foi também sintetizado tendo como base a planta *Salix alba* (VANE, 1971). Atualmente, muitos fármacos utilizados com fins terapêuticos são originados de produtos naturais (MCCURDY; SCULLY, 2005).

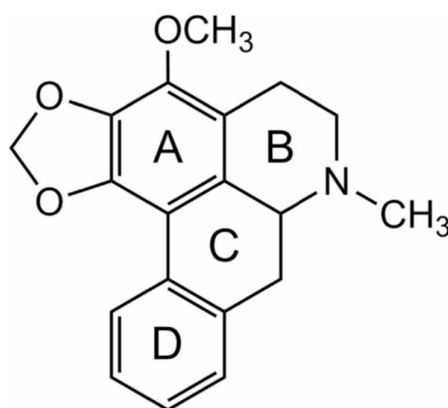
No Brasil existe uma extensa, rica e diversa flora, que nos permite ter acesso a uma grande quantidade de produtos naturais, que podem ser potencialmente ativos como antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e neuromoduladores (BAILÃO et al., 2015; CARVALHO et al., 2013; CORNARA et al., 2017; FRANCHIN et al., 2017; JARDIM et al., 2015; SILVA et al., 2014a).

Neste sentido, nosso grupo tem concentrado esforços na busca por novas moléculas bioativas, eficazes no tratamento de condições dolorosas. Um exemplo é a planta *Annona crassiflora* Mart. pertencente à família *Annonaceae*, uma espécie nativa do cerrado, popularmente conhecida como araticum. A *A. crassiflora* pertence à família *Annonaceae*, que pode ser encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins (LORENZI, 1998). Essa planta é popularmente conhecida como araticum, marolo, fruta- do- conde ou ainda pinha- do- cerrado. Seus frutos são consumidos *in natura* pela população e/ou em forma de compota, geleia, sorvete, entre outros (LORENZI, 1998; 2006).

Essa planta é utilizada na medicina tradicional para combater parasitas, tratar diarreia, reumatismo, feridas, doenças venéreas, picadas de serpentes e piolhos (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; VILAR et al., 2008). Porém, a casca do fruto da *A. crassiflora* é comumente

descartada, pois possui sabor adstringente, o que ocorre devido ao alto teor de compostos fenólicos (ROESLER et al., 2007). ROESLER et al., 2007, demonstrou através da casca do araticum a presença de substâncias com potencial antioxidante no extrato etanólico (por métodos *in vitro*), como por exemplo, a rutina, xantoxilina, ácido ferúlico, cafeico, ascóbio e quínico. Porém, ainda não há muitas informações sobre as características fitoquímicas das substâncias presentes na casca desse fruto. Uma maior compreensão em relação as propriedades biológicas relacionadas aos produtos naturais proporciona mais segurança em relação ao seu consumo e também coopera com a sustentabilidade do bioma do cerrado (JUSTINO, 2016).

JUSTINO (2016), caracterizou o isolamento e identificou vários compostos, incluindo alcalóides da casca da planta. A estefalagina é um alcaloide aporfínico que pode ser encontrado em diversas espécies de plantas, tendo como principal exemplo a família *Lauraceae*. PEREIRA e colaboradores, realizaram a extração de diferentes frações da casca do araticum a fim de isolar o alcaloide aporfínico estefalagina (Figura 1), o fruto utilizado foi coletado no norte de Minas Gerais. As cascas foram submetidas a extração líquido-líquido que produziu a fração alqualoidal (PEREIRA, M. N. et al., 2017).



**Figura 1.** Alcaloide estefalagina isolado da casca da fruta da *A. crassiflora* (PEREIRA, M. N. et al., 2017).

Os alcalóides aporfínicos tem grande destaque nas diferentes espécies de *Annonaceae*, podendo ser encontrados ainda em outras famílias (SILVA, et al., 2007). Nessa classe, há



divisões em subclasses que estão representadas pelo seu perfil estrutural característico, pelas propriedades químicas e biológicas próprias dos subgrupos (BOUSTIE et al., 1998).

A estefalagina é um exemplo de alcaloide aporfínico que pode ser encontrado em diversas plantas. Os alcaloides aporfínicos possuem propriedades biológicas já comprovadas de vasodilatador e anti-hipertensivo, por exemplo (TENG, C.M., et al, 1991; TSAI, T. H., et al., 2008; YU, S. M., et al., 1993; HUANG, R. I., et al., 1998; KONDO, Y. et al., 1990; KONKIMALLA, V. B. et al., 2010; STÉVIGNY, C. et al., 2005). Adicionalmente, alcaloides em geral são bem conhecidos por seu possível potencial analgésico, conforme citado acima. Além disso, estudos recentes demonstraram que um alcaloide aporfínico, a S-(+)- dicentrina, teve um efeito antinociceptivo em modelo de dor visceral em ratos (MONTRUCCHIO, D. P. et al, 2012), o que fez MONTRUCCHIO e colaboradores (2013) investigarem esse efeito em modelos de dor causados por inflamação, e investigar se esse efeito ocorria via interações com canais TRPA1 (MONTRUCCHIO, D. P. et al, 2013). Os pesquisadores observaram que houve comportamento antinociceptivo devido à presença do alcaloide aporfínico na fração administrada por via oral. Obtiveram como resposta a redução da nocicepção espontânea e da hipersensibilidade mecânica e ao frio. Ainda que o mecanismo não seja claro, puderam concluir que houve uma interação do alcaloide com canais TRPA1 (MONTRUCCHIO, D. P. et al., 2013).

Neste sentido, a hipótese do presente trabalho é de que a estefalagina, um alcalóide aporfínico, apresente efeito antinociceptivo via interação com receptores TRPV1 e TRPA1, mostrando-se promissora no tratamento de condições dolorosas agudas e crônicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar o efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina via interação de receptores TRPV1 e TRPA1.

## **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina na dor induzida pela injeção de cinamaldeído;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina na dor induzida pela injeção de formalina;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina na dor induzida pela injeção de capsaicina;
- Verificar se o alcaloide aporfínico estefalagina pode alterar o influxo de cálcio.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 6-8 semanas de idade (20g), provenientes do biotério do Centro de Criação de Camundongos da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, mantidos sob condições de temperatura de 23-25 °C e o com ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética animal da UFU- Umuarama (protocolo 018/17).

### **3.2 Nociceção induzida por cinamaldeído**

Para avaliar o possível envolvimento dos canais TRPA1 no efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina, os camundongos foram submetidos a um teste de dor induzida por cinamaldeído, um ativador específico desses canais. Os camundongos foram pré-tratados com estefalagina (1 mg/kg) via oral, 1h antes da injeção intraplantar de 20µl de

cinamaldeído (1,3 µg / pata) na superfície plantar da pata traseira direita. O grupo controle recebeu apenas a injeção ipl de cinamaldeído, sem tratamento. Imediatamente após a injeção de cinamaldeído, os animais foram colocados em câmaras de vidro (9 x 11 x 13 cm) plana e a resposta nociceptiva foi avaliada por 30 minutos. Foi cronometrado o tempo gasto em lambida e *shaking* da pata injetada e os resultados foram expressos como tempo de respostas nociceptivas.

### **3.3 Nociceção induzida por formalina**

A literatura demonstra que formalina em concentrações de até 1%, quando administrada na pata de camundongos pode causar dor pela ativação de receptores TRPA1. Porém, em concentrações maiores, a segunda fase é desencadeada por outros mecanismos inflamatórios que não a ativação destes receptores (SHIELDS et al., 2010). Para confirmar o possível efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina por outras vias, de caráter inflamatório e independente de TRPA1, os camundongos foram submetidos a um teste de dor induzida por formalina. Os camundongos foram pré-tratados com estefalagina (1 mg/kg) via oral 1h antes da injeção intraplantar de 10 µl de formalina (solução 2,5%) na superfície plantar da pata traseira direita. O grupo controle recebeu apenas a injeção ipl de formalina, sem tratamento. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram colocados em câmaras de vidro (9 x 11 x 13 cm) plana e a resposta nociceptiva foi avaliada por 30 minutos. Foi cronometrado o tempo gasto em lambida e *shaking* da pata injetada e os resultados foram expressos em blocos de 0-5 e de 15-30 minutos.

### **3.4 Nociceção induzida por capsaicina**

Para avaliar o possível envolvimento dos canais TRPV1 no efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina, os camundongos foram submetidos a um teste de dor

induzida por capsaicina, um ativador específico desses canais. Os camundongos foram pré-tratados com estefalagina (0,01-1 mg/kg) via oral, 1h antes da injeção intraplantar (ipl) de 20 µl de capsaicina (1,6 µg / pata) na superfície plantar da pata traseira direita. O grupo controle recebeu apenas a injeção ipl de capsaicina, sem tratamento. Imediatamente após a injeção de capsaicina, os animais foram colocados em câmaras de vidro (9 x 11 x 13 cm) plana e a resposta nociceptiva foi avaliada por 30 minutos. Foi cronometrado o tempo gasto em lambida e *shaking* da pata injetada e os resultados foram expressos como tempo de respostas nociceptivas.

### **3.5 Efeito da estefalagina por influxo de cálcio através da capsaicina**

Muitos estudos demonstram a ativação ou inibição de canais TRPs através do ensaio de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (NASSINI et al., 2011; SO et al., 2016), uma vez que a ativação destes canais envolve o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. O ensaio de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizado como descrito por ROSSATO et al. (2011) e TREVISAN et al. (2014b). Medulas espinhais de camundongos (n=4/experimento) foram removidas para o preparo de sinaptossomas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio (50 mM) adicionado de sacarose (320 mM), pH 7.4. O homogenato foi centrifugado a 1000xg por 5 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi separado e centrifugado novamente a 12.000xg por 20 min a 4°C. O pellet (0,5 mg/ml de proteína) em meio Krebs-Ringer (KRB) (livre de  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi incubado com Fura-2/AM (10 µM) no escuro por 30 min a 37°C. A reação foi interrompida por centrifugação (10.000xg por 2 min a 37°C), e o pellet final foi ressuspensão em 1,5 ml de meio KRB.

Para iniciar a reação,  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) e veículo (DMSO 0,3% ou EtOH 0,25%), diferentes concentrações de estefalagina (30 µg/ml), HC-030031 (30 µM; antagonista TRPA1) ou SB-366791 (30 µM; antagonista TRPV1) foram adicionados. Passados 10 minutos, o agonista TRPA1 cinamaldeído (30 µM) ou a capsaicina (20 µM), agonista TRPV1,

foram adicionados na reação. O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi mensurado por monitoração da fluorescência em excitação (340 e 380 nm) e emissão (510 nm) em um espectrofluorímetro. Foram também registrados os valores máximos de fluorescência após a adição de 10% de Triton-X. Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) da resposta máxima da razão 340/380 nm do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  obtida com Triton-X. Três experimentos independentes foram realizados para determinar o resultado final.

### **3.6 Análise estatística**

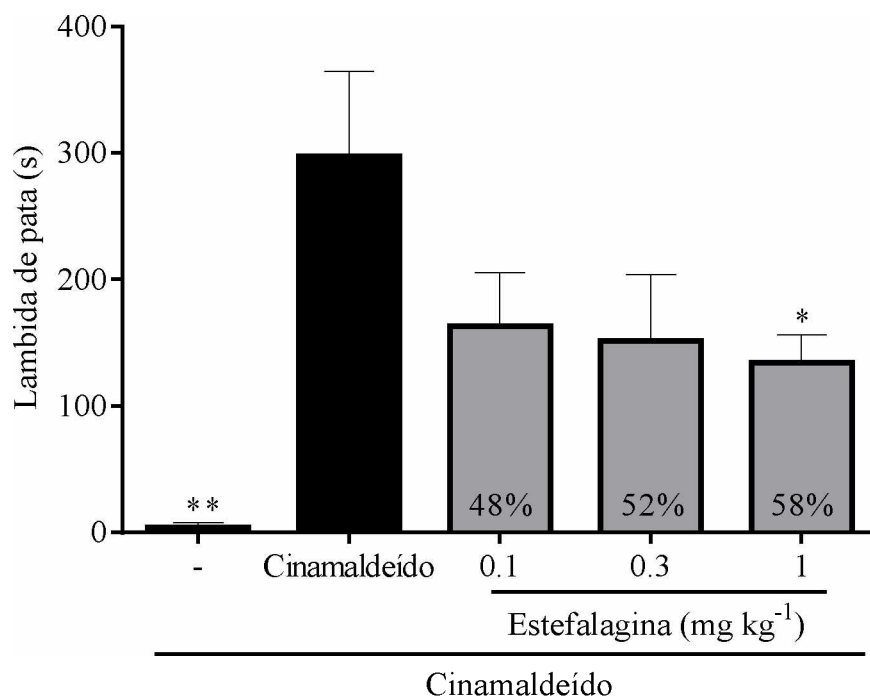
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  SEM mais seus respectivos limites de confiança de 95%. O efeito inibitório máximo ( $E_{\text{max}}$ ) foi calculado com base na resposta dos grupos de controle. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma ou duas vias (medidas repetidas) (ANOVA) seguido de um teste post hoc Newman-Keuls ou Bonferroni. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad 5.0 (San Diego, CA, EUA)

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor induzida pela injeção de cinamaldeído**

Primeiramente, foi investigado o possível efeito antinociceptivo da estefalagina sobre as respostas nociceptivas induzidas por um agonista TRPA1, o cinamaldeído. Na figura 2 é possível observar a confecção de uma curva dose-resposta que foi realizada no modelo de dor induzida por cinamaldeído. As doses de estefalagina utilizadas para a construção da curva foram 0,1, 0,3 e 1 mg  $\text{kg}^{-1}$ . Apesar de haver um perfil que sugere uma redução com essas doses de 0,1 e 0,3 mg  $\text{kg}^{-1}$ , apenas a dose de 1 mg  $\text{kg}^{-1}$  foi capaz de reduzir significativamente

as respostas nociceptivas. A administração oral de 1 mg kg<sup>-1</sup> de estefalagina reduziu em 58% a resposta nociceptiva induzida pela injeção de cinamaldeído ( $p < 0,05$ ). Portanto, nos experimentos seguintes apenas a dose de 1 mg kg<sup>-1</sup> de estefalagina foi utilizada para avaliar o efeito antinociceptivo da mesma sobre as respostas de dor induzidas pela injeção intra-plantar de formalina e capsaicina.

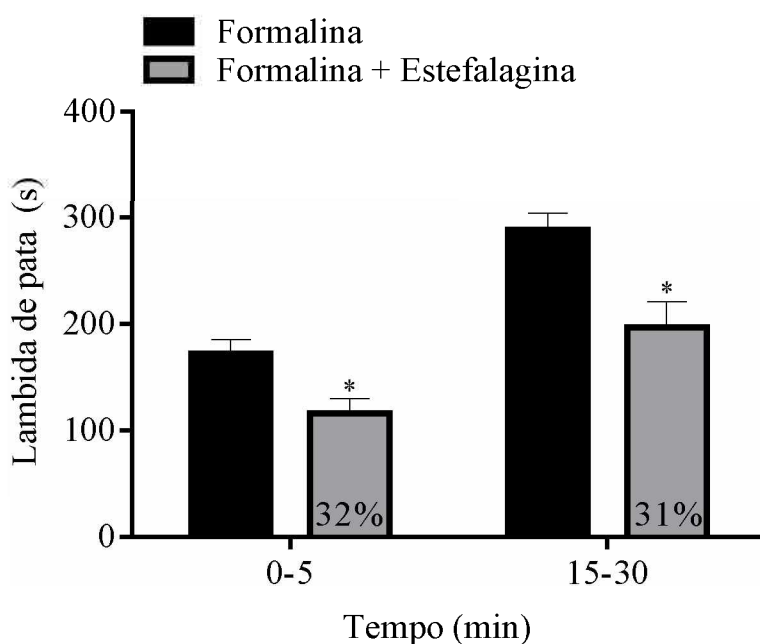


**Figura 2.** Efeitos da administração oral de estefalagina (0,1 - 1,0 mg kg<sup>-1</sup>) no comportamento da dor induzida em camundongos por administração intraplantar de cinamaldeído, um ativador TRPA1. As colunas representam a média ± S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação com o grupo cinamaldeído. Nota: -: controle.

#### 4.2 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor neurogênica e inflamatória induzida pela injeção de formalina

Foi investigado o efeito antinociceptivo da estefalagina sobre respostas nociceptivas induzidas pela formalina (Figura 3), que em concentrações maiores de 1% pode causar dor por mecanismos independentes da ativação TRP (SHIELDS et al., 2010). Podemos observar que houve diminuição da resposta de lambida de pata quando foi dada a injeção de formalina

após a ingestão de 1 mg kg<sup>-1</sup> de estefalagina, quando comparado com a resposta de quando foi somente injetada a formalina i.pl.. Essa resposta foi observada tanto no intervalo de tempo de 0 a 5 minutos (fase neurogênica) quanto no intervalo de tempo de 15 a 30 minutos (fase inflamatória). Nos cinco primeiros minutos, a redução do tempo de lambida foi de 32%, enquanto que nos últimos quinze minutos, essa redução foi de 31% ( $p < 0,05$ ). Esse perfil sugere que houve uma redução significativa na resposta nociceptiva.

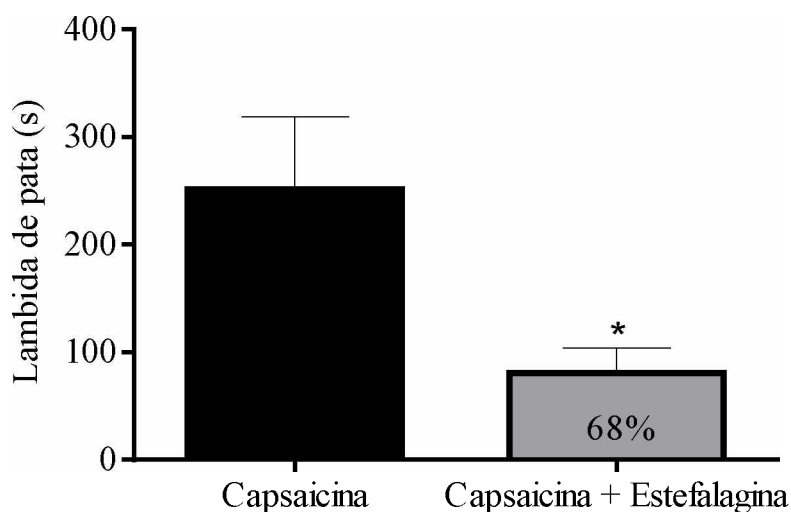


**Figura 3.** Efeitos da administração oral de estefalagina (1 mg kg<sup>-1</sup>) no comportamento de dor induzida por formalina em camundongos. Primeira fase (neurogênica, 0-5 min) e segunda fase (inflamatória, 15-30 min) de comportamento de lambida de pata provocada pela injeção de formalina. As colunas representam a média  $\pm$  S.E.M. T- teste não desempenhado, \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo de formalina.

#### **4.3 Efeito antinociceptivo da estefalagina na dor induzida pela injeção de capsaicina**

Foi investigado o efeito antinociceptivo da estefalagina sobre respostas nociceptivas induzidas por um agonista TRPV1, a capsaicina (Figura 4). Podemos observar que houve diminuição da resposta de lambida de pata quando foi dada a injeção de capsaicina após a

ingestão de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  estefalagina, quando comparado com a resposta de quando foi somente injetada a capsaicina ipl. Essa resposta corresponde ao tempo final de 30 minutos de avaliação da lambida e *shaking* de pata. Podemos notar que houve uma redução significativa de 68% na resposta nociceptiva.



**Figura 4.** Efeitos da administração oral de estefalagina ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no comportamento da dor induzida em camundongos por administração intraplantar de capsaicina, um ativador TRPV1. Comportamento de lambida de pata por 30 minutos provocado pela injeção de capsaicina. As colunas representam a média  $\pm$  S.E.M. T- teste não desempenhado, \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo de capsaicina.

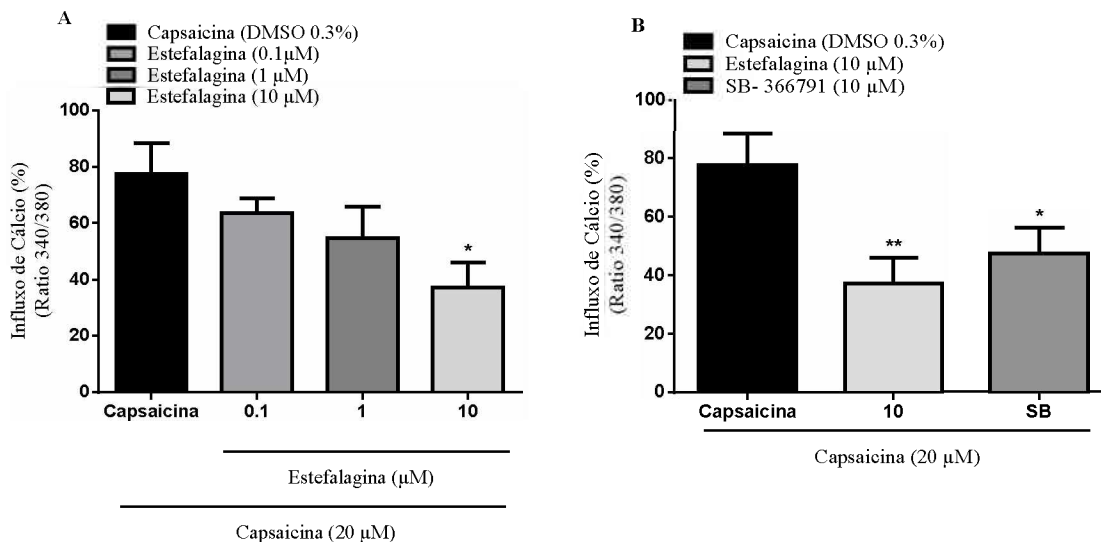
#### 4.4 Influxo de cálcio

Na figura 5.A, é possível observar a confecção de uma curva dose-resposta que foi realizada pelo influxo de  $\text{Ca}^{++}$  *in vitro* induzida pela estefalagina. As doses de estefalagina utilizadas para a construção da curva foram 0,1, 1 e  $10 \mu\text{M}$ . Apesar de haver um perfil que sugere uma redução com essas doses de 0,1 e  $1 \mu\text{M}$ , apenas a dose de  $10 \mu\text{M}$  foi capaz de reduzir significativamente o influxo de  $\text{Ca}^{++}$ , portanto, foi utilizada essa concentração para o experimento feito com DMSO e SB.

A figura 5.B mostra o efeito de interação da estefalagina com os receptores TRPV1, que foram ativados através da aplicação de capsaicina, agonista desse receptor. Podemos



observar que houve uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) do influxo de  $\text{Ca}^{++}$  causado pela capsaicina quando administrada a estefalagina ( $10 \mu\text{M}$ ).



**Figura 5. A:** Efeitos da administração da estefalagina ( $0,1 - 1 \mu\text{M}$ ) no influxo de cálcio induzido *in vitro* com administração de capsaicina, um ativador TRPV1. As colunas representam a média  $\pm$  S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo DMSO ( $0,3\%$ ). Nota: -: controle. **B:** Efeito da estefalagina ( $10 \mu\text{M}$ ) no influxo de cálcio induzido *in vitro* com administração de capsaicina, um ativador TRPV1. As colunas representam a média  $\pm$  S.E.M. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação com DMSO ( $0,3\%$ ). Nota: -: controle.

## 5. DISCUSSÃO

Os produtos naturais são utilizados no tratamento de doenças e são considerados importantes fontes de investigação de novos fármacos, mostrando-se promissor o estudo de moléculas bioativas eficazes no tratamento de condições dolorosas. Compostos oriundos de produtos naturais, tais como alcaloides aporfinicos, podem agir pela via de ativação dos TRPs (CALIXTO et al., 2005). A ativação dos canais TRPV1 e TRPA1, que são canais polimodais, ocorre, entre outras coisas, por substâncias naturais irritantes como a capsaicina, o cinamaldeído e a formalina (JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005). Dessa maneira, a estefalagina, um alcaloide aporfinico, poderia apresentar efeitos antinociceptivos via ativação

dos receptores TRPV1 e TRPA1. Desta forma, no presente estudo avaliamos o possível efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico estefalagina via interação com receptores TRPV1 e TRPA1, através de injeções intraplantares de agonistas dos receptores TRPV1 (capsaicina) e TRPA1 (cinamaldeído e formalina) em camundongos, e análise da interação direta do alcaloide com receptores TRPV1 através do influxo de cálcio induzido por capsaicina.

Os receptores TRPA1 podem ser ativados por estímulos oriundos de produtos naturais como o cinamaldeído e a cânfora (BANDELL, M. et al. 2004; BAUTISTA, D. M. et al., 2005; JORDT, S. E. et al., 2004; MCNAMARA, C.R., 2007). Também podem ser ativados em condições inflamatórias, pois mediadores inflamatórios como bradicinina e prostaglandinas podem modular a ativação destes receptores de maneira indireta (DA COSTA, D. S. M., et al., 2010).

MONTRUCCHIO (2012), relatou que a S-(+)- dicentrina, um alcaloide aporfínico, teve efeito antinociceptivo em um modelo de dor visceral em ratos. Este mesmo grupo investigou o possível envolvimento de canais TRPA1 nestes efeitos antinociceptivos do alcaloide. Os pesquisadores puderam observar que a S-(+)- dicentrina teve capacidade de reduzir o tempo de lambida induzido pelo cinamaldeído, um agonista TRPA1, e esse resultado foi similar ao evocado pelo tratamento com cânfora, um antagonista TRPA1 não seletivo, utilizado no estudo como controle positivo. Em relação a estes achados, podemos observar que no presente trabalho, houve redução da resposta nociceptiva induzida por cinamaldeído quando estes animais foram submetidos ao tratamento por via oral com o alcaloide estefalagina nas três doses testadas, sem diferenças significativas entre as doses. Essa diminuição da resposta nociceptiva sugere que a estefalagina possa estar interagindo com os canais TRPA1, diminuindo sua ativação. Contudo, mais estudos serão necessários para estabelecer se esta redução dos efeitos nociceptivos resultantes da ativação TRPA1 se dá por interação direta ou indireta com o canal.

A formalina tem a capacidade de modular a ativação de receptores TRPA1, quando utilizada em concentrações de até 1%, além disso é amplamente usada como método de estudo comportamental para análise da efetividade de agentes antinociceptivos. SHIELDS e colaboradores (2010) demonstraram que em baixas concentrações ( $\leq 0,5\%$ ), a formalina interage com o canal de cátions não seletivo TRPA1 (MACPHERSON, L. J., et al., 2007; MCNAMARA C. R., et al., 2007), que é expresso em um subconjunto de fibras sensoriais periféricas que tem por característica a expressão do receptor TRPV1 (KOBAYASHI, K. et al., 2005; STORY, G. M. et al., 2003). Shields et. al. (2010) também relataram que as respostas comportamentais e celulares (realizadas pela indução da proteína Fos na medula espinhal) produzidas por injeção da baixa concentração de formalina dependiam destes nociceptores, responsivos a estímulos como calor e capsaicina, e que isto se dava, muito provavelmente, através de interações com os canais TRPV1. Os pesquisadores demonstraram que a nocicepção aguda foi observada após a injeção de uma concentração relativamente baixa de formalina (0,5%), não visualizada em animais com a deleção genética de receptores TRPA1, e após a injeção de uma maior concentração (2%), ocorria nocicepção mesmo na ausência deste receptor.

O teste da formalina se divide em duas fases onde há clara manifestação de nocicepção nos roedores. Até 5 minutos de sua injeção se desenvolve a fase neurogênica ou aguda, com estimulação química direta dos nociceptores em partes de fibras A $\delta$  e fibras aferentes do tipo C, ambas associadas à liberação de SP, óxido nítrico e aminoácidos excitatórios. Já na avaliação de 15 a 30 minutos após a injeção de formalina ocorre a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo, a bradicinina, prostaglandinas e serotoninas. Os dez minutos entre a primeira avaliação e a segunda, é conhecida como intervalo de quiescência, que ocorre devido a uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos espinhas e supra-espinhais (HUNKSKAAR & HOLE, 1987). Portanto, com base

nos resultados apresentados, houve uma resposta antinociceptiva induzida pela estefalagina nas duas fases de dor evocadas pela formalina, que pode ser devido a sua interação com o receptor TRPA1. Como foi utilizada uma concentração de formalina de 2,5%, que de acordo com a literatura, é uma concentração na qual a formalina é capaz de ativar vias que independem da modulação de receptores TRPA1, supõem-se que, o efeito analgésico da estefalagina observado aqui pode ser associado ainda a um efeito anti- inflamatório. Contudo, mais análises devem ser realizadas para a comprovação desta especulação.

A capsaicina ativa seletivamente os receptores TRPV1, que assim como os TRPA1, estão envolvidos em vias de sinalização da dor. Capaz de integrar vários estímulos mecânicos, térmicos e químicos que provocam dor, o receptor TRPV1 é considerado um potencial alvo para o desenvolvimentos de analgésicos (SZALLASI et al., 2007). Amplamente distribuído no organismo, o TRPV1 pode agir como um sensor para diversos estímulos nocivos diferentes, bem como na medula espinhal, que participa da passagem do estímulo doloroso (PATAPOUTIAN et al., 2009). De acordo com os resultados aqui descritos nós pudemos observar que a estefalagina teve efeito antinociceptivo frente a administração de seu agonista, a capsaicina. Estes resultados também sugerem a interação do alcaloide com os receptores TRPV1, contudo não podemos até este momento definir se esta interação é direta ou indireta.

De acordo com a literatura, vários estudos demonstram efeitos antinociceptivos de antagonistas dos canais TRPA1 e TRPV1 em diferentes modelos de dor, aguda e crônica. ROSSATO (2010), averiguou que o flavonóide eriodictiol interagia com o canal TRPV1 através de ensaio de influxo de  $Ca^{++}$  estimulado por capsaicina, onde foi observado que o eriodictiol foi capaz de promover diminuição do influxo de  $Ca^{++}$ , sugerindo que o composto agia como um antagonista do canal. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o eriodictiol foi capaz de inibir o influxo de  $Ca^{++}$  com uma potência maior que alguns antagonistas clássicos do receptor TRPV1, como por exemplo o SB-366791 (10 mg/Kg, p.o.). De acordo

com estes achados, foi demonstrado no presente estudo que a estefalagina foi capaz de inibir o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  causado pela aplicação de capsaicina em fatias de medula espinhal de camundongos. Estes resultados foram bem similares aos encontrados para o tratamento com o antagonista seletivo dos receptores TRPV1, SB-366791, utilizado como controle positivo. Portanto, podemos sugerir que a estefalagina tem efeito antinociceptivo via interação com canais TRPV1 que sugerem que a mesma atue diretamente sobre o canal. Contudo, ensaios de ligação específica podem ser realizados para que se alcancem conclusões mais específicas sobre esta interação.

## **6. CONCLUSÃO**

Podemos concluir que a estefalagina atua diminuindo a nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1 e TRPA1 em camundongos, assim como, a nocicepção induzida por formalina. Sendo assim, acreditamos que a estefalagina possa ser uma substância promissora para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas e sua possível interação com receptores TRP pode ser melhor investigada.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. 1a ed. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1987.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacol Ther**, v. 133, p. 189-204. 2012.
- AVERILL, S.; MCMAHON, S.B.; CLARY, D.O.; REICHARDT, L.F.; PRIESTLEY, J.V. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. **Eur J Neurosci** 7(7):1484-1494, 1995.
- BAILÃO, E. F. L. C. et al. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015.
- BANDELL M, STORY GM, HWANG SW, VISWANATH V, EID SR, PETRUS MJ, EARLEY TJ, PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004; 41: 849-57.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267-284. 2009.
- BAUTISTA, D. M. et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 12248-12252. 2005.
- BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, v. 124, p. 1269-1282. 2006.
- BOUSTIE, J. et al. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. **Journal of natural products**, v. 61, n. 4, p. 480-484, 1998.
- CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA J. Contribution of natural products to the Discovery of the transient receptor potential (TRP) channels Family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics* 106 (2005) 179-208.
- CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA2s inhibitors isolated from brazilian plants: Synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824. 1997.
- CAVANAUGH J. M., WEINSTEIN J. N. Low back pain: epidemiology, anatomy and neurophysiology. In: Wall PD, Melzack R, organizadores. *Textbook of pain*. New York (NY): Livingstone; 1994.
- CAVANAUGH, D.J.; LEE, H.; LO, L.; SHIELDS, S.D.; ZYLKA, M.J.; BASBAUM, A.I.; ANDERSON, D.J. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate

- behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(22):9075-9080, 2009.
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, v. 426, p. 517-524. 2003.
- CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–20, 2017.
- CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. (2007) TRP channels and pain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (2007) 978-988.
- CUELLO, A.C.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; MA, W.; DE KONINCK, Y.; HENRY, J.L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regul Pept** 46(1-2):155-164, 1993.
- DA SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. The medicinal chemistry of Chikungunya virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 16, p. 4219–4244, 2017.
- DA COSTA D. S. M., MEOTTI F. C., ANDRADE E. L., LEAL P. C., MOTTA E. M., et al. (2010). The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148: 431–7.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth** 101(1):8-16, 2008.
- FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.
- HUANG R.L., CHEN C.C., HUANG Y.L. (1998). Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Med* 64: 212–5.
- HUNSKAAR S. & HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30(1): 103 – 14, 1987.
- HUNT, C.C.; MC, I.A. An analysis of fibre diameter and receptor characteristics of myelinated cutaneous afferent fibres in cat. **J Physiol** 153:99-112, 1960.
- IGGO, A. Cutaneous heat and cold receptors with slowly conducting (C) afferent fibres. **Q J Exp Physiol Cogn Med Sci** 44(362-370), 1959.
- IGGO, A. Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibres. **J Physiol**. 152:337-353, 1960.
- INOUE H, ASAKA T, NAGATA N, KOSHIHARA, Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 1997; 333: 231- 40.
- JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 274, p. 7325-7333. 1999.

JARDIM, A. C. G. et al. Natural compounds isolated from Brazilian plants are potent inhibitors of hepatitis C virus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 115, p. 39–47, 2015.

JORDT S.E., BAUTISTA D.M., CHUANG H.H., MCKEMY D.D., ZYGMUNT P.M., HOGESTATT E.D., MENG I.D., JULIUS D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004; 427: 260-5.

JUSTINO, A.B. (2016) Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ - glicosidase e glicação não enzimática. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil, 2016.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Princípios de Neurociência. São Paulo: Manole, 2003.

KOBAYASHI, K., FUKUOKA, T., OBATA, K., YAMANAKA, H., DAI, Y., TOKUNAGA, A., NOGUCHI, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/cfibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 2005;493:596–606. [PubMed: 16304633]

KONDO Y., IMAI Y., HOJO H., ENDO T., NOZOE S (1990). Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *J Pharmacobiodyn* 13: 426–431.

KONKIMALLA V.B., EFFERTH T. (2010). Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aporphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. *Biochem Pharmacol* 79: 1092–1099.

KRELING, M.C.G.D., et al. Prevalência de dor crônica em adultos. *Revista Brasileira de Enfermagem (REBEn)* 2006, p. 509-513.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, p. 989-1003. 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. vol. 2, 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. 352p.

LORENZI H, MATOS FJ, FRANCISCO JM. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

MACPHERSON, L. J.; XIAO, B.; KWAN, K.Y.; PETRUS, M. J.; DUBIN, A. E.; HWNAG, S.; CRAVATT, B.; COREY, D. P., PATAPOUTIAN, A. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci* 2007;27:11412– 11415. [PubMed: 17942735]

MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 476–84, 22 dez. 2005.

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. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13525–13530. [PubMed: 17686976]
- MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: MCMAHON SB, KOLTZENBURG M. Wall and Melzack's Textbook of Pain. Philadelphia: Elsevier, p. 3–34, 2008.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6): 355 – 474, 2002.
- MINKE, B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. **J Neurogenet**, v. 24, p. 216-233. 2010.
- MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L.; FLOCKERZI, V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, v. 108, p. 595-598. 2002.
- MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci STKE**, v. 2005, p. re3.2005.
- MONTRUCCHIO D.P., MIGUEL O.G., ZANIN S.M.W., SILVA G.A., CARDOZO A.M., et al. (2012). Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. *Planta Med* 78: 1543–8.
- MONTRUCCHIO D.P., CORDOVA M.M., SANTOS A.R.S. (2013) Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. *PLoS ONE* 8(7): e67730. doi:10.1371/journal.pone.0067730.
- MORAN, M. M. et al. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, p. 601-620. 2011.
- NASSINI, R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain*, v. 152, p. 1621–1631, 2011.
- NILIUS B., VOETS T., PETERS J. TRP channels in disease. *Science's STKE*. 2005; 295: 19.
- NILIUS, B. TRP channels in disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, p. 805-812.2007.
- OLIVEIRA, L. M. As Dores. In: Lent, R. Neurociência da Mente e do Comportamento. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8. p. 183-201. 2008.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 55-68. 2009.
- PATIL, M. J.; JESKE, N. A.; AKOPIAN, A. N. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca<sup>2+</sup>. *Neuroscience*, v. 171, p. 1109-1119. 2010.
- PEDERSEN S.F., OWSIANIK G., NILIUS B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 2005;38: 233-52.

PEREIRA, M. N. et al., Stephalagine, na alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart.. *Industrial Crops and Products* 97 (2017) 324-329.

PETERS E.M., ERICSON M.E., HOSOI J., SEIFFERT K., HORDINSKY M.K., ANSEL J.C., PAUS R., SCHOLZEN T.E. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. *J Investig Dermatol* 2006; 126: 1937- 47.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem**, v. 104, p. 1048-1054, 2007.

ROSSATO, M. F., Eriodictiol: um flavonóide antagonista do receptor TRPV1 com atividade antioxidante. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica). Centro de Ciências Naturais e Exatas. Santa Maria, RS, Brasil, 2010.

ROSSATO, M. F. et al. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 81, n. 4, p. 544–551, 2011.

SCHERRER, G.; IMAMACHI, N.; CAO, Y.Q.; CONTET, C.; MENNICKEN, F.; O'DONNELL, D.; KIEFFER, B.L.; BASBAUM, A.I. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. **Cell** 137(6):1148-1159, 2009.

SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Pract**, v. 10, p. 185-200. 2010.

SHERRINGTON, C. S. *The Integrative Action of the Nervous System*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1906.

SHIELDS, S.D.; CAVANAUGH, D.J.; Lee, H.; ANDERSON, D.J.; BASBAUM, A.I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 2010; 151: 422–9. doi: 10.1016/j. pain.2010.08.001 PMID: 20832171.

SILVA, D. B. D. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v.30, n.8, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, F. et al. Stressing Conditions as Tools to Boost the Biosynthesis of Valuable Plant Natural Products. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 89–101, abr. 2014a.

SO, K. et al. Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia / reperfusion in mice. *Scientific Reports*, p. 1–12, 2016.

STÉVIGNY, BAILLY C., QUENTIN-LECLERCQ J. (2005). Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 173–182.

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. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819– 829. [PubMed: 12654248]

- SZALLASI, A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, p. 357-372. 2007.
- TEIXEIRA M.J., SHIBATA M.K., PIMENTA C.A.M., CORRÊA C.F. Dor no Brasil: estado atual e perspectivas. In: Teixeira MJ, Corrêa CF, and Pimenta CAM, organizadores. Dor: conceitos gerais. São Paulo (SP): Limay; 1995.
- TEIXEIRA, R. R. et al. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. **Molecules**, v. 19, p. 8151–8176, 2014.
- TENG C.M., YU S.M., KO F.N., CHEN C.C., HUANG Y.L., et al. (1991). Dicentrine, a natural vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. *Br J Pharmacol* 104: 651–6.
- TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple painproducing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531-543. 1998.
- TREVISAN, G. et al. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 387, n. 7, p. 679–689, 2014.
- TSAI T.H., WANG G.J., LIN L.C. (2008). Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassipoupa filiformis*. *J Nat Prod* 71: 289–291.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature: New biology**, v. 231, n. 25, p. 232–5, 23 jun. 1971.
- VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz J Biol**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.
- VON KORFF M., DWORKIN S., LERESCHE L. Graded chronic pain status: an epidemiologic evaluation. *Pain* 1990; 40: 279-91.
- VRIENS, J.; APPENDINO, G.; NILIUS, B. Pharmacology of vanilloid transiente receptor potential cation channels. **Mol Pharmacol**, v. 75, p. 1262-1279. 2009.
- WONG, G. Y.; GAVVA, N. R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. **Brain ResRev**, v. 60, p. 267-277. 2009.
- YU SM, Kang YF, Chen CC, Teng CM (1993). Effects of dicentrine on haemodynamic, plasma lipid, lipoprotein level and vascular reactivity in hyperlipidaemic rats. *Br J Pharmacol* 108: 1055–61.