

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

RODRIGO MARCON

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO
DOS TRITERPENOS SEMI-SINTÉTICOS:
OCTANOATO DE ALFA E BETA-AMIRINA**

Florianópolis

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

RODRIGO MARCON

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO
DOS TRITERPENOS SEMI-SINTÉTICOS:
OCTANOATO DE ALFA E BETA-AMIRINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-orientadora: Dr^a. Maria Fernanda de Paula Werner

Florianópolis

2009

*“Nunca tenha medo de tentar algo novo. Lembre-se de que um amador solitário
construiu a Arca. Um grande grupo de profissionais construiu o Titanic”*

Luiz Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os caminhos onde passei e pelas pessoas maravilhosas que colocaste na minha vida.

Aos meus pais, Odacir e Oldina, que através de muita dedicação e suor conseguiram mandar seu valioso dinheiro para que eu me dedicasse exclusivamente aos estudos, pela confiança, carinho, dedicação e amizade, enfim pelo amor eterno entre pais e filhos.

Ao professor e orientador Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, que pela sua dedicação e amor a ciência nos transmitiu ensinamentos valiosos e sábios, que às vezes ultrapassavam as paredes do laboratório e nos serviam para a vida, uma pessoa de coração enorme que acolhe com amor e carinho quem o cerca, quero deixar um agradecimento especial a esse grande orientador e grande ser humano, obrigado por tudo meu amigo.

A minha co-orientadora Dr. Maria Fernanda de Paula Werner, obrigado, não aguentei em agradecer somente no final, pois quero que você saiba o quanto foi fundamental para meu aprendizado, tenho certeza que se tornará grande professora, pois todos os fundamentos necessários você os tem, obrigado pela confiança, carinho e dedicação, seu caminho na ciência está apenas começando, muitos serão os frutos que irá colher.

À Viviane, pelo companheirismo, seja em momentos ruins ou em momentos bons, pela sua generosidade, humildade e seu grande amor, pessoa com um coração puro que me faz feliz há anos.

Ao meu irmão Ricardo, exemplo de dedicação e esforço, grande pessoa, amigo, companheiro, um irmão que sempre quis ter e por isso agradeço novamente aos meus pais por nos ensinar valores que vamos passar para nossos filhos.

Aos meus avôs, lembro muito de vocês, muito obrigado a todos, mas principalmente minha “noninha” Zelita, foram muitas as vezes que eu viajava e ela ficava chorando ao me ver partir, aos 80 anos sempre disposta a trabalhar, grande exemplo de vida.

Aos meus amigos Allisson, Rafaela e Carlos e Cristina pelo incentivo, apoio, ajuda em todos os momentos, amigos como estes a gente tem que cuidar e manter por perto, eles não são irmãos de sangue, mas são de vida.

Aos meus amigos Daniel Martins, Francisney Pinto do Nascimento (Ney) e Vinícius Gadotti, pelas suas incansáveis idéias, pela confiança, simplicidade, companheirismo, grandes pessoas e grandes amigos.

A Cristiane, Denise, Leonardo “Leo” e Ana Paula, agradeço a vocês pelo acolhimento, confiança, pelos ótimos finais de semana trabalhando ou indo a praia, enfim, pela grande família que se tornou os integrantes e agregados do “Overnight Lounge Club”, obrigado por tudo.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Débora, Patrícia, Morgana, Marina, Leidiane, Francisco, Daniela Longhi, Juliana Gonçalves, Breno, Bira, Igã, Camila, Liana, Rafael, Maíra, Flávia, Daniela Leite, Mari Appel, Andreza, como eu gostaria de estar sempre perto de vocês, obrigado amigos.

Aos meus colegas e amigos da graduação, Fernanda, Saulo, Gelso, Bruno, Valdomiro, Naila, Márcio, Fabiana, Sâmia, Tais, Camila, Nicole, Tiago... ô povo querido, tenho saudades de vocês.

Aos professores da pós-graduação em Farmacologia e aos da pós-graduação em Neurociências, pelos conhecimentos transmitidos.

A Diana, secretária da pós-graduação em Farmacologia e Nivaldo, secretário da pós-graduação em Neurociência, pela atenção e competência em todos os momentos.

A dona Vilma e ao seu Carlos, pelos vários momentos de descontração, esses dois moram no meu coração.

A CNPq, FAPESC, UFSC pelo auxílio financeiro.

Aos animais de laboratório, sem eles este trabalho não seria realizado.

Agradeço a todos colegas que a partir de 2003 se tornaram minha família e que infelizmente não foram citados, mas foram muito importante para meu amadurecimento.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	ix
Lista de Tabelas e Esquemas	xii
Lista de figuras.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor	1
1.2 Nocicepção	3
1.3 Mediadores envolvidos no processo nociceptivo	6
1.4 Vias e a transmissão da nocicepção	12
1.5 Processo inflamatório	15
1.6 Produtos Naturais	17
1.7 Alfa e beta-amirina	19
1.8 Octanoato de alfa e beta-amirina	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Síntese do octanoato de α e β-amirina	27
3.3 Nocicepção induzida pelo ácido acético	28
3.4 Nocicepção induzida pela formalina	29
3.5 Nocicepção induzida pelo glutamato	30

3.6 Nocicepção induzida pela capsaicina	30
3.7 Resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de glutamato, substância P e capsaicina	31
3.8 Envolvimento do receptor TRPV1	32
3.9 Estudo do Mecanismo de Ação	32
3.9.1 Envolvimento das fibras sensíveis a capsaicina	33
3.9.2 Envolvimento da proteína G sensível a Toxina Pertussis	33
3.9.3 Envolvimento do sistema opióide	34
3.9.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico	34
3.9.5 Envolvimento do sistema α_2 -adrenérgico	35
3.9.6 Envolvimento do sistema colinérgico	35
3.9.7 Hiperálgia térmica e mecânica induzida por PGE ₂ , BK e PMA	36
3.9.8 Nocicepção induzida pelo PMA	37
3.9.9 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares	37
3.9.10 Western Blot	38
3.10 Estudo da atividade antiinflamatória	39
3.10.1 Avaliação da atividade antiedematogênica do octanoato de α e β -amirina no modelo de edema de pata	39
3.10.2 Avaliação da atividade antiinflamatória do octanoato de α e β -amirina no modelo de pleurisia	39
3.10.3 Ensaio de mieloperoxidase	41
3.10.4 Dosagem de IL-1 β e TNF- α da pata	41
3.11 Medida do desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal	41
3.12 Drogas e Reagentes	42

3.13 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	46
4.1 Nociceção induzida pelo ácido acético	46
4.2 Nociceção induzida pela formalina	48
4.3 Nociceção induzida pelo glutamato	49
4.4 Nociceção induzida pela capsaicina	50
4.5 Medida do desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal	51
4.6. Nociceção induzida pela administração intratecal de glutamato, substância P e capsaicina	52
4.7 Envolvimento do receptor TRPV-1	53
4.8 Estudo do mecanismo de ação	54
4.8.1 Envolvimento das fibras sensíveis a capsaicina	54
4.8.2 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ e dos sistemas, opióide, serotoninérgico, α_2 -adrenérgico e colinérgico	55
4.8.3 Hiperalgisia térmica e mecânica induzida por PGE_2 , BK e PMA	57
4.8.4 Nociceção induzida pelo PMA e western blot para $PKC\epsilon$	59
4.9 Avaliação da atividade antiinflamatória	61
4.9.1 Avaliação da atividade antiinflamatória no modelo do edema de pata	61
4.9.2 Dosagem de MPO, IL-1 β e TNF- α da pata de camundongos	62
4.9.3 Avaliação da atividade antiinflamatória no modelo de pleurisia	64
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE ABREVIÇÕES

%	Por cento
°C	Graus Celsius
<	Menor que
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μ	Micro
ε	Épsilon
γ	Gama
θ	Theta
η	Eta
ζ	Zeta
AA	Ácido araquidônico
AAE	Aminoácido Excitatório
AC	Adenilato Ciclase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canal iônico sensível a ácido
ASS	Ácido acetilsalicílico
ATP	Trifosfato de adenosina
B1	Receptor de bradicinina 1
B2	Receptor de bradicinina 2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BK	Bradicinina
Cap	Capsaicina
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionada ao gene da calcitonina
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
5-HT	Serotonina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DAG	Diacilglicerol

DI₅₀	Dose inibitória em 50%
DTT	Ditiotreitol
E.P.M.	Erro padrão da média
e.v.	Endovenoso
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Glu	Glutamato
h	Horas
HTAB	hexadeciltrimetil amônio
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1β	Interleucina 1- β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP₃	Inositol trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
min	Minuto
mm	Milímetros
mM	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
m/s	Metros por segundo
NaCl	Cloreto de sódio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NPY	Neuropeptide Y
OA	Octanoato de α e β -amirina
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PCPA	DL-p-clorofenilalanina-metil-éster
PGE₂	Prostaglandina E ₂

PGI₂	Prostaciclina I ₂
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PMA	Miristado de acetato de forbol
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto
PVDF	Polivinilidenodifluorido
s.c.	Subcutâneo
SiO₂	Sílica gel
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TLC	Cromatografia de camada delgada
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRP	Receptor de potencial transiente
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide 1
TRPV2	Receptor de potencial transiente vanilóide 2
TRPA1	Receptor de potencial transiente anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transiente melastatina 8
TTXr	Canal de sódio sensível a tetrodotoxina
UI	Unidades internacionais
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v	Volume
V.d.	Volume direito
V.e.	Volume esquerdo
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1: Efeito do octanoato de α e β -amirina no desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal de camundongos	51
Tabela 2: Nocicepção induzida pela capsaicina na pata de camundongos	53
Tabela 3: Avaliação do mecanismo de ação do octanoato de α e β -amirina utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesão tecidual seguida de liberação de mediadores químicos e ativação de fibra nociceptiva do tipo C ou A δ	11
Figura 2: Percepção da dor.....	14
Figura 3: Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, α -amirina (A) e β -amirina (B).....	19
Figura 4: Estrutura química dos dois triterpenos pentacíclicos, octanoato de α -amirina (A) e octanoato de β -amirina (B).....	22
Figura 5: Efeito da administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos.....	47
Figura 6: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	48
Figura 7: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	49
Figura 8: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	50
Figura 9: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato, SP e capsaicina em camundongos.....	52
Figura 10: Efeito do octanoato de α e β -amirina em resposta ao tratamento neonatal com capsaicina em camundongos.....	54
Figura 11: Efeito do octanoato de α e β -amirina frente à indução de hiperalgesia térmica e mecânica em ratos.	58
Figura 12: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre a nocicepção e a ativação da PKC ϵ induzida pelo PMA em camundongos.....	60

Figura 13: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina em camundongos.....	61
Figura 14: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre os níveis teciduais da MPO, IL-1 β e TNF- α após a administração intraplantar de carragenina em camundongos.....	63
Figura 15: Efeito do octanoato de α e β -amirina ou dexametasona na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.....	65

RESUMO

O presente estudo avaliou a possível ação antinociceptiva e antiinflamatória do derivado semi-sintético do triterpeno α e β -amirina: denominado octanoato de α e β -amirina (OA), em vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, em ratos e camundongos. O OA quando administrado pela via intraperitoneal (i.p.) (0,0001 – 0,1 mg/kg) ou oral (v.o.) (1 – 30 mg/kg), 30 e 60 min antes do teste, reduziu significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com DI_{50} de 0,003 (0,001-0,005) e 7,15 (5,94–8,60) mg/kg e inibições de $85 \pm 5\%$ e $72 \pm 9\%$, para a via i.p. e v.o., respectivamente. Além disso, o OA manteve seu efeito por até 8 h após sua administração i.p. no modelo de ácido acético. O pré-tratamento com OA (0,1 – 30 mg/kg) reduziu significativamente a nocicepção de origem inflamatória em $89 \pm 6\%$ e DI_{50} de 5,36 (3,98–7,23) mg/kg, mas não alterou a nocicepção de origem neurogênica induzidas pela formalina. O OA (0,001-1 mg/kg, i.p.), também reduziu a nocicepção induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de glutamato e capsaicina, com DI_{50} de 0,04 (0,03-0,08) mg/kg e 1,36 (1,12-2,22) mg/kg e inibição de $65 \pm 5\%$ e $57 \pm 7\%$, respectivamente. Além disso, o OA (0,1 mg/kg) causou redução da resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal (i.t.) de glutamato, substância P e capsaicina, com inibições de $36 \pm 1\%$, $67 \pm 1\%$ e $68 \pm 1\%$, respectivamente. Perifericamente, a nocicepção causada pela capsaicina (0,2 nmol/pata, agonista seletivo dos receptores TRPV1) foi parcialmente revertida pela co-administração com OA (1,8 nmol/pata) ou capsazepina (0,2 nmol/pata, antagonista seletivo dos receptores TRPV1) com reversão de $77 \pm 5\%$ e $50 \pm 4\%$, respectivamente. No modelo do ácido acético, a antinocicepção causada pelo OA (0,1mg/kg, i.p.) foi revertida pelo pré-tratamento com capsaicina (50 mg/kg, s.c., no período neonatal, depletor de fibras C e A δ que expressam o TRPV1), mas não em animais tratados com toxina Pertussis (1 μ g/sítio, i.t., inativador da proteína G $_{i/o}$), naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores opióides), PCPA (100 mg/kg, i.p., inibidor da enzima triptofano hidroxilase e depletor de serotonina endógena), ioimbina (0,15 mg/kg, i.p., antagonista seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos), mecamilamina (2 mg/kg, i.p., antagonista seletivo dos receptores nicotínicos $\alpha_2\beta_3$) e atropina (1 mg/kg, i.p., antagonista seletivo dos receptores muscarínicos). Além disso, o OA (0,1-1 mg/kg) foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica em $76 \pm 7\%$ e $91 \pm 4\%$ e mecânica em 100% e $91 \pm 2\%$, induzidas pela injeção intraplantar de BK e PMA, respectivamente. Embora, o mesmo tratamento não alterou a hiperalgesia provocada pela PGE $_2$ em ratos. Além disso, o pré-tratamento com OA (3-30 mg/kg) reduziu a nocicepção induzida pela administração intraplantar de PMA (500 pmol/pata) com DI_{50} de 19,6 (13,5-28,8) mg/kg e inibição de $64 \pm 9\%$. Contudo, não alterou a translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana em comparação com animais tratados com veículo. A atividade antiinflamatória foi avaliada no modelo de edema de pata induzido pela carragenina (300 μ g/pata), onde foi observado que o pré-tratamento com o OA (0,1 – 10 mg/kg) reduziu significativamente e de forma dependente da dose o edema de pata, além disso, a Indometacina (4 mg/kg, Ind) também reduziu significativamente o edema. Os mesmo tratamentos com o OA e Ind diminuíram a atividade da MPO na pata em 100% e $60 \pm 8\%$, respectivamente e DI_{50} 0,2 (0,05 – 0,45) mg/kg para o OA. Tanto o tratamento sistêmico com OA (10 mg/kg) quanto com Ind (4 mg/kg) reduziram a níveis basais a quantidade de IL-1 β , mas não alteraram a quantidade de TNF- α

presentes na pata dos animais que receberam carragenina. No modelo de pleurisia foi observado que o tratamento sistêmico com OA (0,1 – 10 mg/kg) reduziu significativamente e de forma dependente da dose a migração total de leucócitos e polimorfonucleares no líquido pleural e os níveis de MPO no pulmão, com DI_{50} de 4,5 (2,3 – 9,1), 4,7 (2,6-8,3) e 2,2 (0,3 – 7,2) mg/kg e redução de $57 \pm 1\%$, $72 \pm 5\%$ e $95 \pm 2\%$, respectivamente. Embora o mesmo tratamento não tenha alterado o extravasamento plasmático e também a migração de células mononucleares para a cavidade pleural. O tratamento com dexametasona (1 mg/kg, s.c.) também reduziu a migração total de leucócitos, migração de polimorfonuclear, atividade da MPO no pulmão e o extravasamento plasmático, com inibição de $63 \pm 8\%$, $71 \pm 1\%$ e $93 \pm 3\%$, $33 \pm 7\%$ respectivamente. Em síntese, estes resultados indicam que o OA possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória em modelos químicos de dor e inflamação, através de mecanismos que podem envolver a interação com fibras aferentes sensíveis a capsaicina, bem como, pode interagir com outros membros da família da PKC, sem interferir com a PKC ϵ . Além disso, o OA pode estar inibindo direta ou indiretamente a ação, produção ou liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na geração da dor e da inflamação.

ABSTRACT

The present study investigated the possible antinociceptive and anti-inflammatory actions of the semi-synthetic derivative from α - and β -amyrin: denominated α - and β -amyrin octanoate (AO), in several *in vivo* and *in vitro* experimental models, in rats and mice. AO administered by intraperitoneal route (i.p.) (0.0001 – 0.1 mg/kg) or oral (p.o.) (1 – 30 mg/kg), 30 and 60 min before, significantly reduced acetic acid-induced abdominal constrictions, with ID_{50} of 0.003 (0.001-0.005) and 7.15 (5.94–8.60) mg/kg and inhibition of $85 \pm 5\%$ and $72 \pm 9\%$, for i.p. and p.o. route, respectively. Furthermore, the antinociceptive effect of AO was maintained by 8 h after its administration by i.p. route, in the acetic acid-induced nociception model. Pretreatment with AO (0.1 – 30 mg/kg) significantly reduced the inflammatory phase: $89 \pm 6\%$ and ID_{50} of 5.36 (3.98–7.23) mg/kg, but did not affect the neurogenic phase of the formalin-induced nociception. AO (0.001-1 mg/kg, i.p.) also decreased glutamate- and capsaicin-induced nociception, with ID_{50} of 0.04 (0.03-0.08) mg/kg and 1.36 (1.12-2.22) mg/kg and inhibition of $65 \pm 5\%$ and $57 \pm 7\%$, respectively. Furthermore, AO (0.1 mg/kg) caused reduction of intrathecal (i.t.) administration of glutamate, substance P and capsaicin with inhibition of $36 \pm 1\%$, $67 \pm 1\%$ and $68 \pm 1\%$, respectively. The nociception caused by capsaicin (0.2 nmol/paw, selective agonist of TRPV1 receptors) was partially reversed by co-administration with AO (1.8 nmol/paw) or capsazepine (0.2 nmol/paw, selective antagonist of TRPV1 receptors) with reversion of $77 \pm 5\%$ and $50 \pm 4\%$, respectively. In the acetic acid model the antinociception caused by AO (0.1 mg/kg, i.p.) was reversed by pretreatment with capsaicin (50 mg/kg, on the 2nd day of life with the purpose of inducing the irreversible degeneration of afferent neurons, like C and A δ fibers) but not in animals treated with pertussis toxin (1 μ g/site, i.t., an inactivator of Gi/o protein), naloxone (1 mg/kg, i.p., a non-selective antagonist of opioid receptors), PCPA (100 mg/kg, i.p., a tryptophan hydroxylase inactivator and depletor of endogenous serotonin), yohimbine (0.15 mg/kg, i.p., a selective antagonist of α_2 -adrenoreceptors), mecamylamine (2 mg/kg, i.p., a selective antagonist of nicotinic receptors $\alpha_2\beta_3$) and atropine (1 mg/kg, i.p., a selective antagonist of muscarinic receptors). Furthermore, AO (0.1-1 mg/kg) was capable of reversing thermal ($76 \pm 7\%$ and $91 \pm 4\%$) and mechanical hyperalgesia at (100% and $91 \pm 2\%$), induced by intraplantar injection of BK and PMA, respectively. On the other hand, AO did not alter PGE₂-induced hyperalgesia in rats. In addition, the pretreatment of AO (3-30 mg/kg) reduced PMA-induced nociception with ID_{50} at 19.6 (13.5-28.8) mg/kg and inhibition of $64 \pm 9\%$. Nevertheless, AO treatment was not able to alter PKC ϵ translocation of cytosol to membrane. The anti-inflammatory activity was evaluated in carrageenan-induced paw edema. We observed that AO pretreatment (0.1-10 mg/kg) significantly reduced in a dose-dependent manner the paw edema, furthermore, indometacin (4 mg/kg, Ind) also significantly reduced paw edema. Either the treatment with AO or Ind reduced the levels of MPO into the paw at 100% and $60 \pm 8\%$, respectively. The ID_{50} of AO for this parameter was 0.2 (0.05 – 0.45) mg/kg. Moreover the treatment with either AO (10 mg/kg) or Ind (4 mg/kg) reduced to basal levels the amount of IL-1 β into the animals paw. The carrageenan-induced pleurisy it was observed that the systemic treatment with AO (0.1 – 10 mg/kg) significantly reduced in a dose dependent manner the total leukocytes and polymorphonuclear migration in the pleural exudates and MPO levels in the lung with ID_{50} of 4.5 (2.3 – 9.1), 4.7 (2.6-8.3) and 2.2 (0.3 –

7.2) mg/kg reduction of $57 \pm 1\%$, $72 \pm 5\%$ and $95 \pm 2\%$, respectively. However, the same treatment did not alter plasmatic extravasations. Treatment with dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) also reduced the total leukocytes, polymorphonuclear migration and plasmatic extravasations in the pleural exudates and MPO activity in the lung, with inhibition of $63 \pm 8\%$, $71 \pm 1\%$, $33 \pm 7\%$ and $93 \pm 3\%$, respectively. Together, these results indicate that AO presents antinociceptive and anti-inflammatory properties in several models of chemical pain and inflammatory through mechanisms that involve an interaction with afferents capsaicin-sensitive fibers, as well as, it can interact with other members of PKC family, without interfering with the PKC ϵ . Furthermore, the AO could be direct or indirectly inhibiting the action, production or liberation of pro-inflammatory mediators involved in the generation of pain and inflammation.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor é uma sensação essencial para a vida. Ela nos ensina a evitar situações danosas, desencadeando reflexos para que ocorra a retirada do corpo ou parte dele para longe do estímulo nocivo, além de induzir a manter em repouso regiões lesionadas (Julius *et al.*, 2001). Reforçando a importância da sensação dolorosa, sabe-se que pacientes insensíveis a dor apresentam baixa expectativa de vida, bem como vivem em constante perigo de autodestruição (Bear, 2006). Apesar da dor ser uma sensação fundamental para a sobrevivência, quando persistente provoca sofrimento e reações emocionais negativas, reduzindo a qualidade de vida do indivíduo (Chapman *et al.*, 1999; Julius *et al.*, 2001).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (Loeser *et al.*, 1999). Sendo diferente da nocicepção, que é o um processo puramente fisiológico, o qual envolve estruturas neurais que codificam e processam o estímulo nocivo (Loeser *et al.*, 2008). Sendo assim, a dor tem eventos peculiares que a diferenciam da nocicepção, já que características emocionais estão envolvidas na modulação da sensação dolorosa (Loeser *et al.*, 1999). Assim, indivíduos podem ter o mesmo estímulo nociceptivo, contudo, a dor pode ser diferente, dependendo do contexto em que o mesmo se encontra (Tracey *et al.*, 2002).

Em relação à duração da sensação dolorosa, ela pode ser dividida em três categorias: dor passageira (transitória), dor aguda e dor crônica. A dor passageira é caracterizada por ativação de nociceptores tanto da pele quanto de outros tecidos e ocorre na ausência de qualquer dano tecidual, ela tem curta duração e acaba por se dissipar dentro de poucos segundos ou minutos sem a necessidade de utilização de medicamento; provavelmente sua função é proteger o indivíduo de um possível dano tecidual. Já a dor aguda, é caracterizada por lesão tecidual eminente que leva à ativação direta dos nociceptores, ela pode persistir por dias ou poucas semanas e desaparece quando ocorre recuperação da lesão, podendo ser provocada por

traumas, intervenções cirúrgicas e algumas doenças e são atenuadas por agentes analgésicos como os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). E a terceira categoria é a dor crônica, a qual pode ser gerada por lesões ou doenças, tais como fibromialgia e neuralgia, podendo ser perpetuada por fatores diferentes do causador primário e se prolongar por semanas, meses e até anos. A dor crônica é distinta da aguda pelo fato de ocorrer plasticidade do sistema nervoso central e periférico e por manter-se após a recuperação tecidual, o que a torna de difícil tratamento perante a utilização de fármacos (Loeser *et al.*, 1999; Millan, 1999).

A sensação de dor pode ser influenciada por vários mecanismos e mediadores, culminando em seu desaparecimento (dor passageira) ou agravamento (dor crônica), sendo em alguns casos debilitante ao indivíduo. De fato, mudanças na percepção dolorosa podem ocorrer após um trauma ou lesão tecidual, a qual provoca ativação dos nociceptores e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Esses mediadores por sua vez, podem levar à sensibilização de nociceptores, provocando o fenômeno denominado de hiperalgesia. Assim, em regiões onde a percepção da dor seria amena, após a sensibilização é percebido uma sensação dolorosa significativamente maior (Millan, 1999).

Segundo as novas resoluções da IASP, outro caso especial de hiperalgesia é denominado de alodínia (Loeser *et al.*, 2008). A alodínia é ocasionada em resposta à sensibilização central, referente à excitabilidade de neurônios do corno dorsal, provocada pelos altos níveis de atividade de aferentes nociceptivos. Como resultado da sensibilização dos aferentes, ocorre redução do limiar de ativação do nociceptor, fazendo com que ele seja mais facilmente ativado por estímulos de baixa intensidade. Embora a sensibilização central dispare o potencial de ação em resposta à atividade nociceptiva, os efeitos podem ser generalizados para outras entradas sensoriais, como as fibras mecanocéptivas e propioceptivas, dessa forma, a ativação periférica de receptores táteis acabam ganhando acesso ao processamento nociceptivo central e assim estímulos não-nociceptivos, como o roçar de uma roupa sobre a pele, o vento, o frio, etc, podem causar dor (Millan, 1999; Haddad, 2007; Loeser *et al.*, 2008).

1.2 Nocicepção

Há mais de 100 anos Sherrington propôs a existência de subpopulações de neurônios primários com características somatosensoriais, os quais são ativados somente por estímulos capazes de causar uma lesão (Para revisão ver Julius e Basbaum, 2001). Desta forma, Sherrington denominou esses neurônios primários que possuíam a capacidade de serem evocados frente a estímulos nocivos de nociceptores (*noci* é uma palavra derivada do Latim *nocere*, que significa ferir), os quais teriam campos receptivos especializados e limiares de ativação diferentes de outras fibras nervosas sensoriais. Mais adiante, através do uso de técnicas como eletrofisiologia, foi comprovada a existência dessas estruturas especializadas, que tem a capacidade de transduzir e codificar estímulos nocivos de diferentes categorias (Burgess *et al.*, 1967; Le Bars *et al.*, 2001; Loeser *et al.*, 2008).

Como outros receptores cutâneos e subcutâneos, os nociceptores são sensíveis a uma variedade de estímulos, os quais disparam potenciais de ação em neurônios aferentes primários. Além disso, os nociceptores, bem como outros receptores sensoriais somáticos possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, que enviam um ramo axonal para a periferia e outro para a medula espinhal ou tronco encefálico. Os campos receptivos desses neurônios nociceptivos estão localizados na porção periférica, culminando em terminações nervosas livres, esses terminais neuronais se ramificam amplamente em regiões abaixo da derme e epiderme, bem como em alguns tecidos mais profundos, como vasos, músculos, articulações e vísceras (Julius *et al.*, 2001).

Os nociceptores estão associados a dois tipos de fibras sensoriais, as quais propagam o sinal com velocidades diferentes devido à presença ou não de mielina em seus axônios. Uma delas é do tipo C, a qual não é mielinizada e responde a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química e por este motivo são denominados de nociceptores polimodais (Lawson, 2002; Coutaux *et al.*, 2005). Cerca de 60-90% dos neurônios aferentes primários, de origem cutânea ou de tecidos mais profundos correspondem a fibras do tipo C, embora, desse percentual, 10-20% são nociceptores silenciosos, os quais geralmente não respondem a estímulos nocivos agudos. Eles são influenciados por mediadores inflamatórios,

tornando-se sensibilizados e passando somente assim a propagar o estímulo nociceptivo (Julius *et al.*, 2001).

Outra fibra sensorial diretamente relacionada à nocicepção é a A δ , ela possui pouca mielina e propaga o sinal de forma mais rápida que a fibra do tipo C. Os nociceptores relacionados a esta fibra respondem a estímulos nocivos de origem térmica e mecânica (Melzack, 1999). As fibras A δ se dividem em tipo I e tipo II. As fibras do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas em torno de 53 °C, enquanto que as fibras do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C (Lawson, 2002; Craig, 2003; Coutaux *et al.*, 2005).

Além das fibras acima descritas, as fibras A α e A β também compõem os aferentes primários somatosensoriais. As fibras A α são caracterizadas por apresentar grande quantidade de mielina revestindo os axônios, sendo encontradas principalmente em fusos musculares e órgãos tendinosos de Golgi e sua função é predominantemente a mecanocepção e propriocepção. As fibras do tipo A β são encobertas por grande quantidade de mielina, embora, quando comparada com as fibras A α possua uma quantidade ligeiramente menor, sua principal função é a percepção de estímulos como o toque não nocivo. A estimulação direta em qualquer frequência de fibras sensoriais do tipo A α e A β , em humanos, conduzem rapidamente o estímulo, porém, não produzem sensações descritas como dolorosas (Almeida *et al.*, 2004). Embora, nem todas as fibras A α e A β estejam envolvidas somente na propriocepção e mecanocepção, estudos feitos em ratos mostram que cerca de 20% delas conduzem estímulos nociceptivos (Djoughri *et al.*, 2004).

A característica da resposta dos nociceptores a diferentes temperaturas passou a ser mais bem compreendida após a clonagem do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1, do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*). Em resposta a agonistas exógenos como a capsaicina (um princípio ativo extraído da pimenta), o receptor TRPV1 abre o poro do canal, que é permeável ao sódio e ao cálcio e provoca a despolarização de fibras nociceptivas do tipo C e A δ do tipo II (Julius *et al.*, 2001; Belmonte *et al.*, 2008). Além disso, estímulos nocivos térmicos em torno de 47 °C ativam as mesmas fibras que expressam o receptor TRPV1, o que demonstra sua possível participação na percepção ao calor nocivo (Caterina *et al.*, 1997). A estimulação do receptor TRPV1 em resposta ao calor também pode ser potencializada por substâncias liberadas no processo inflamatório, como prótons e a

anandamida, além de outros mediadores que ativam a via da proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*), a qual pode sensibilizar o receptor TRPV1, tornando-o mais facilmente responsivo (Julius *et al.*, 2001).

Contudo, a deleção gênica do receptor TRPV1 em animais, não altera uma porcentagem de neurônios que respondiam a altas temperaturas, em torno de 50 °C, o que levou a se pensar sobre a existência de outros mecanismos importantes para a detecção do estímulo nocivo térmico (Caterina *et al.*, 1999). Deste então, um candidato para esta resposta foi descoberto e denominado de TRPV2, o qual pertence à família dos receptores de potencial transitório (TRP). O receptor TRPV2 não é sensível a capsaicina e pode ser ativado por temperaturas superiores a 50 °C (Caterina *et al.*, 1999). Esses receptores são expressos em fibras de médio diâmetro A δ do tipo I o que reforça o fato deles serem os responsáveis pela detecção de estímulos térmicos acima de 50 °C (Ahluwalia *et al.*, 2002).

A sensação térmica ao frio nocivo também é detectada pelos nociceptores, contudo, os receptores que percebem este estímulo são distintos dos que são sensíveis a altas temperaturas (Caterina *et al.*, 2000). De fato, os receptor de potencial transitório melastatina 8 (TRPM8, do inglês *transient receptor potential melastatin 8*) foram identificados e caracterizados como os responsáveis pela detecção de estímulos térmicos em torno de 26 °C (Mckemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002; Dhaka *et al.*, 2006). Além do TRPM8, foi identificado o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1 do inglês *transient receptor potential ankyrin 1*), o qual responde a temperaturas nocivas inferiores a 17 °C (Story *et al.*, 2003). Estes receptores são encontrados em neurônios nociceptivos sensíveis a capsaicina, o que reforça seu papel na transmissão dolorosa (Dhaka *et al.*, 2006; Belmonte *et al.*, 2008).

Os nociceptores também podem ser ativados por estímulos mecânicos potencialmente capazes de causar um dano real ou potencial ao tecido, como pressão e deformação tecidual, além do estresse mecânico (Julius *et al.*, 2001). Atualmente, têm se demonstrado que a estimulação mecânica leve, proporciona ativação de canais iônicos com estruturas relacionadas com os canais de sódio sensíveis a amilorida, esses canais denominados de DEG/ENaC são homólogos aos canais sensíveis a ácido (ASIC1, ASIC2 e ASIC3) e são expressos em neurônios aferentes primários, o que tem implicado em sua participação na mecanotransdução (Julius *et al.*, 2001). Além disso, tem sido proposto um mecanismo alternativo de

sensibilização do nociceptor por estresse mecânico. Um candidato é a adenosina trifosfato (ATP), ele é liberado por células que sofreram estiramento e pode excitar os neurônios aferentes primários por ligação a seus receptores (Krishtal *et al.*, 1988; Sutherland *et al.*, 2000). De fato, trabalhos mostram que o estiramento da musculatura lisa da bexiga causa liberação do ATP, e animais com deleção gênica para o receptor de ATP denominado P2X₃, tem evidenciado o seu papel na transdução do sinal doloroso em decorrência da estimulação mecânica (Cockayne *et al.*, 2000; Julius *et al.*, 2001).

1.3 Medidores Envolvidos no Processo Nociceptivo

Tanto a sensação dolorosa provocada por estimulação térmica, quanto às de origem mecânica, podem ser moduladas, se no local estiver sendo liberados mediadores do processo inflamatório (Julius *et al.*, 2001). De fato, muitos mediadores pró-inflamatórios interagem com seus receptores presentes em nociceptores, causando tanto sensibilização, quanto ativação destes neurônios nociceptivos (Figura 1) (Besson, 1999; Millan, 1999; Julius *et al.*, 2001). Muitas dessas substâncias químicas são liberadas após o dano tecidual, sejam elas por células vasculares ou plaquetas, ou células de origem imunológica, como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e mastócitos (Besson, 1999). Além disso, quando esses mediadores são administrados intradermicamente podem induzir reações nociceptivas, através da ativação direta do nociceptor ou por sensibilizar este neurônio para outros diferentes estímulos, como térmico e/ou mecânico (Besson, 1999; Millan, 1999).

Uma lesão tecidual, inflamação ou acidose resulta na ativação de várias substâncias, como a enzima proteolítica calicreína (Marceau, 1995). Esta enzima degrada um peptídeo circulante chamado cininogênio que, por sua vez da origem a dois peptídeos, a bradicinina (BK, do inglês *bradikynin*) e a calidina (Marceau, 1995). Estes dois peptídeos são rapidamente metabolizados em des-arg⁹-BK e des-arg¹⁰-calidina, respectivamente. A maioria dos efeitos apresentados pelas cininas são mediados pela ativação de dois tipos de receptores ligados a proteína G, o receptor B₁ e o receptor B₂. Os receptores B₂ são constitutivos e amplamente expressos no

sistema nervoso central e periférico, e são importantes para o efeito fisiológico das cininas, sendo preferencialmente ativados pela BK e pela calidina (Hall, 1997). Com algumas exceções, o receptor B₁ não é constitutivamente presente no tecido normal, mas sua expressão ocorre rapidamente em certas condições patológicas ou em condições inflamatórias (Marceau *et al.*, 1998). A BK é conhecida como um poderoso agente álgico (Lang *et al.*, 1990; Manning *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 1992) e seu efeito nociceptivo parece envolver a ativação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ) (Chuang *et al.*, 2001), resultando na fosforilação e ativação de inúmeros mecanismo intracelulares (Premkumar *et al.*, 2000).

Além das cininas, no processo inflamatório são produzidos e liberados muitos outros mediadores, como os derivados de fosfolipídios de membrana. Dentre esses produtos podemos destacar os prostanóides. Eles são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico através da ação da enzima ciclooxigenase (COX), que pode ser encontrada em duas isoformas, a COX-1 que é constitutivamente presente nos tecidos, e a COX-2, que na maioria das vezes é expressa em resposta ao processo inflamatório (Millan, 1999). A COX-1 é responsável pela rápida produção de prostaglandinas responsáveis pelas funções fisiológicas e a COX-2 está principalmente envolvida no desenvolvimento e progressão de processos inflamatórios (Mitchell *et al.*, 1995).

Dentre os vários prostanóides sintetizados pela ação das enzimas COX, podemos destacar dois deles, a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostacilina I₂ (PGI₂). Eles são grandes contribuintes da hiperalgesia em processos inflamatórios (Coleman, 1994; Matsumura *et al.*, 1995; Boie *et al.*, 1997; Millan, 1999). Embora, a aplicação de PGE₂ e PGI₂ na pele geralmente não seja dolorosa, elas promovem a sensibilização do nociceptor, principalmente através do aumento da condutância de canais de cátions sensíveis a voltagem, além de aumentar a liberação de neuropeptídeos provenientes das fibras C nos terminais periféricos (Sanchez-Prieto *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1998; Millan, 1999). De fato, foi demonstrado que a administração intratecal de PGE₂ causa hipersensibilidade tanto pré-sinápticamente, em terminais centrais dos nociceptores (Nishihara *et al.*, 1995) quanto pós-sinápticamente, por alterar a excitabilidade de neurônios do corno dorsal (Uda *et al.*, 1990).

A serotonina (5-HT), como outros neurotransmissores, também é liberada em resposta ao dano tecidual e inflamação, sendo proveniente principalmente de

plaquetas, mastócitos e células endoteliais, bem como de terminais serotoninérgicos centrais (Pierce *et al.*, 1997) e ajuda na sensibilização e ativação dos neurônios nociceptivos (Julius *et al.*, 2001). A administração de 5-HT na pele causa dor em humanos (Millan, 1999) através da excitação das fibras C e A δ , e parece ocorrer principalmente pela ligação da serotonina com os receptores do tipo 5-HT₃. Os receptores 5-HT₃ são canais iônicos permeáveis ao sódio e ao potássio, e sua abertura permite o influxo de cargas positivas para o interior do neurônio, culminando na geração do potencial de ação rumo ao corno dorsal da medula espinhal (Millan, 1999).

Outros mediadores, como o ATP, também são liberados após um dano tecidual. Ele provoca rápida despolarização de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, refletindo em grande entrada de cátions na célula (Bouvier *et al.*, 1991; Rang *et al.*, 1991). Além disso, células inflamatórias, plaquetas, células endoteliais, células de Schwann e os próprios terminais periféricos e centrais ajudam na liberação local de outros mediadores químicos, como o glutamato (Glu), e outros aminoácidos excitatórios (EAAs), neuropeptídios, como substância P (SP) o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o óxido nítrico (NO), neurotrofinas, histamina, prótons, citocinas, somatostatina, acetilcolina, enzimas como as lectinas, NPY, CCK entre outros (Besson, 1999; Millan, 1999; Julius *et al.*, 2001; Griffis *et al.*, 2006). Esses mediadores interagem com receptores específicos levando a sensibilização ou ativação direta do nociceptor (Carlton, 1998; Pasero, 1999; Raja, 1999).

Mediadores químicos como o glutamato, serotonina, ATP, prótons, adenosina, dentre outros, liberados frente a uma lesão tecidual, podem atuar diretamente em canais iônicos presentes em neurônios nociceptivos e por eles proporcionar o influxo de cátions para o interior da célula, o que conseqüentemente deflagra o potencial de ação (Julius *et al.*, 2001; Grundy, 2002). No entanto, outros mediadores inflamatórios, como a BK, SP e as PGs, não atuam diretamente em canais iônicos, e sim em receptores de sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, podendo causar tanto ativação, quanto sensibilização nos nociceptores. De fato, muitos mediadores inflamatórios ao estimular os receptores acoplados à proteína G acabam ativando várias vias intracelulares, principalmente por atuarem através da proteína quinase C (PKC) ou através da proteína quinase A (PKA) acarretando em complexos sinais intracelulares (Figura 1) (Levitan, 1994).

Muitas substâncias produzidas e liberadas frente à lesão tecidual, como a BK e a SP se ligam a receptores acoplados a proteína Gq e estimulam a atividade da fosfolipase C β (PLC β), esta enzima degrada o fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP $_2$), gerando dois produtos, o inositol trifosfato (IP $_3$) e o diacilglicerol (DAG) (Velazquez *et al.*, 2007). O IP $_3$ é hidrossolúvel e se encontra no citoplasma celular, onde se liga a receptores no retículo endoplasmático e provoca a liberação de cálcio no interior de célula. O DAG é hidrofóbico e fica ancorado na membrana da célula, e juntamente com o cálcio liberado ativam alguns membros da família da PKC (Wetsel *et al.*, 1992). A PKC é uma proteína da família das quinases serina/treonina que são divididas em três grupos, baseado na dependência ao cálcio e ao DAG. As isoformas α , β I, β II, e γ são dependentes de ambos, cálcio e DAG; as PKCs δ , ϵ , η , e θ são dependentes de DAG mas não de cálcio. Por fim, as isoformas ξ e λ I são independentes de cálcio e DAG (Velazquez *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que a ativação da PKC pode sensibilizar e despolarizar neurônios aferentes não-mielinizados (Dray *et al.*, 1988; Rang *et al.*, 1988; Schepelmann *et al.*, 1993) principalmente por aumentar as correntes excitatórias ativadas por estímulos térmicos nocivos (Cesare *et al.*, 1996). Além disso, inibidores da PKC podem bloquear a sensibilização desses aferentes (Burgess *et al.*, 1989; Mcguirk *et al.*, 1992). Com o desenvolvimento de animais deficientes de PKC ϵ e a utilização de inibidores dessa PKC foi demonstrado seu papel fundamental na nocicepção (Cesare *et al.*, 1999; Khasar, Lin *et al.*, 1999). A PKC ϵ possivelmente modula a via nociceptiva por fosforilar os receptores do tipo TRPV1, deixando-os sensíveis a estímulos nocivos de origem térmica e química (Hwang *et al.*, 2000). Além disso, tem sido relatado que a PKC α também pode provocar ativação dos nociceptores por atuar em receptores do tipo TRPV1 (Velazquez *et al.*, 2007).

Alguns mediadores e neurotransmissores podem interagir com outros receptores acoplados as proteínas G, culminando na estimulação da enzima adenilato ciclase. A adenilato ciclase utiliza o ATP presente no citoplasma celular para formar a adenosina-monofosfato cíclico (AMPc). Este segundo mensageiro formado se liga a locais específicos da proteína quinase A (PKA), levando a sua ativação (Rang *et al.*, 2003). O receptor TRPV1 e também canais de sódio resistentes a tetrodotoxina são exemplos de proteínas fosforiladas pela PKA, sendo, portanto, dois mecanismos importantes que podem causar sensibilização e

despolarização dos neurônios nociceptivos (Bhave *et al.*, 2002). A ativação de ambas, PKA e PKC foram relatadas como as maiores contribuintes para a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂ e pela BK (Cunha *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2002). De fato, foi demonstrado que a PGE₂ induz a fosforilação de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina presente em nociceptores os deixando sensível a despolarização e este efeito parece envolver a ativação da via AMPc e PKA (England *et al.*, 1996).

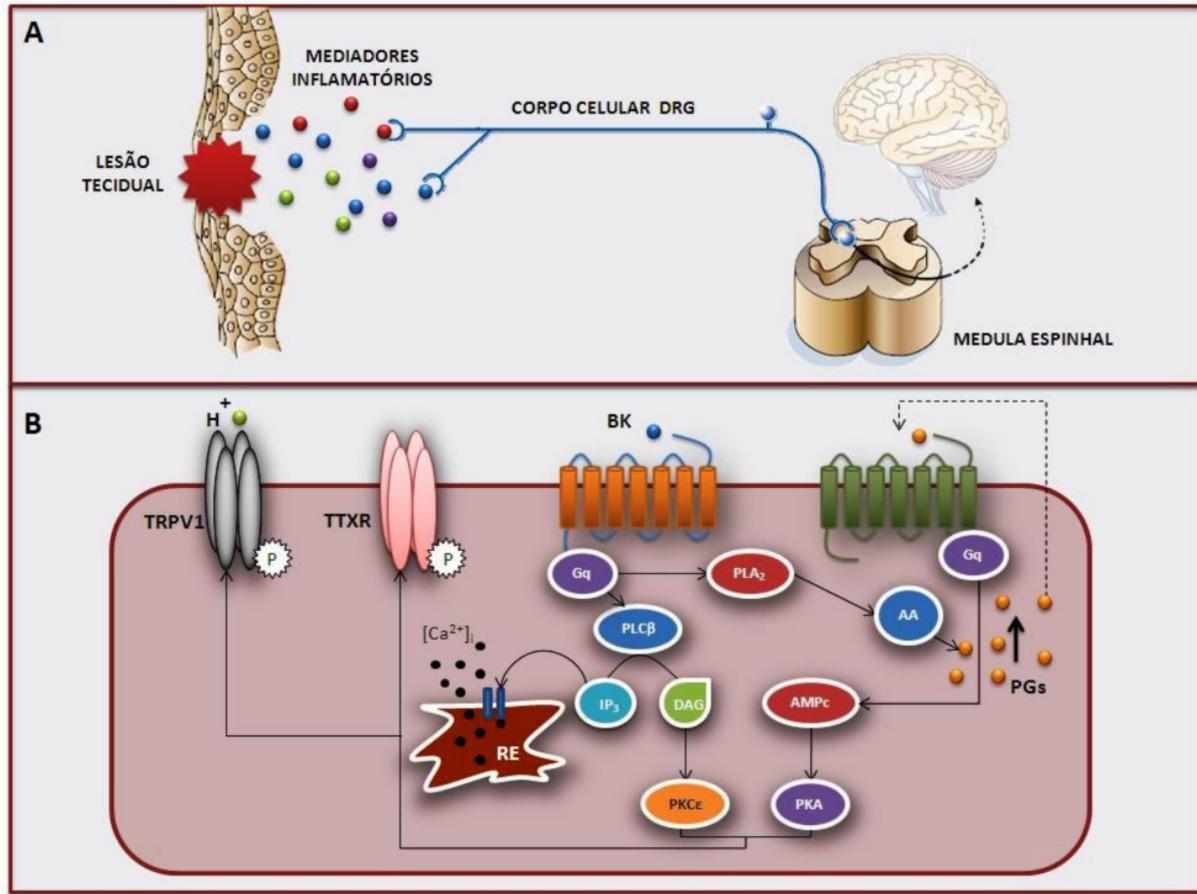


Figura 1: Lesão tecidual seguida de liberação de mediadores químicos e ativação de fibra nociceptiva do tipo C ou A δ . A figura (A) mostra que após uma lesão tecidual ocorre a liberação de mediadores químicos que interagem com fibras do tipo C e A δ . Essas fibras entram na medula espinhal pelo corno dorsal, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem que ascendem para o sistema nervoso central. A figura (B) está representando simplificada as fibras nociceptivas tanto do tipo C quanto A δ . Alguns mediadores, como a bradicinina (BK) ativam receptores acoplados a proteína Gq, e culminam na ativação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ). A PKC ϵ fosforila o receptor TRPV1 e canais de sódio sensíveis a tetrodotoxina (TTXr) os deixando sensíveis a abertura. A BK pode ativar a fosfolipase A2 (PLA2) que degrada fosfolípidios de membrana (PLP) e produz o ácido araquidônico (AA) culminando na formação de prostaglandinas (PGs). As PGs atuam em receptores acoplados a proteína Gs, na qual ativa a enzima adenilato ciclase (AC) a formar a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) através da utilização do ATP. O AMPc por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), que irá fosforilar alguns alvos intracelulares, como os (TTXr) e o TRPV1, os deixando sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos. Adaptado de (Julius *et al.*, 2001).

1.4 Vias e a Transmissão da Nocicepção

O potencial de ação gerado na periferia frente a estímulos nocivos é propagado nos neurônios nociceptivos principalmente pela ação de canais de sódio, cálcio e potássio dependentes de voltagem (McCleskey *et al.*, 1999). Estes neurônios de primeira ordem emitem projeções para a medula espinhal, mais especificamente na região do corno dorsal, onde fazem sinapses, através da liberação de neurotransmissores, tanto com interneurônios, quanto com neurônios de projeção (Figura 2) (Millan, 1999).

Ao entrar na medula espinhal, os neurônios somatossensoriais trazendo informações da periferia se projetam através do corno dorsal em diferentes lâminas espinhais, onde realizam conexões e sinapses (Craig, 2003). De fato, os aferentes primários chegam à medula de forma organizada: i) as fibras A β responsáveis por sensações de mecanoccepção e propriocepção terminam em lâminas mais profundas, como III, IV, V e VI; ii) fibras C e A δ que propagam informações nociceptivas de todo o corpo, projetam-se para lâminas mais superficiais, como I, II e IV onde fazem mono e poli-sinapses com neurônios de segunda ordem que ascendem para as regiões superiores (Craig, 2003).

Os neurônios provenientes da periferia liberam várias substâncias que são responsáveis pela interação sináptica com outros neurônios, como a SP (Kuraishi *et al.*, 1989), CGRP (Saria *et al.*, 1986), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Yaksh *et al.*, 1982), somatostatina (Morton *et al.*, 1988), glutamato (Skilling *et al.*, 1988), ATP (Matsuka *et al.*, 2001) fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) (Lever *et al.*, 2001). Esses múltiplos transmissores podem conferir efeitos excitatórios tanto agudos, quando crônicos em neurônios de segunda ordem, acarretando em consequências pós-sinápticas extremamente complexas.

Em resposta aos neurotransmissores liberados na medula espinhal, os neurônios de segunda ordem, ou de projeção, são despolarizam e transmitem sinal para centros superiores. Esses neurônios de segunda ordem ascendem por diferentes tratos, como os espinotalâmicos, trigeminal, espinoparabraquial e espinomesencefálico, sendo os mais importantes para a condução nociceptiva. Uma das vias nociceptivas mais estudadas a respeito da transmissão do sinal nociceptivo

é a via espinotalâmica (Melzack, 1999; Millan, 1999). Os axônios desta via decussam imediatamente e ascendem pela região contralateral, até atingir o tálamo, sem sofrer sinapses no decorrer do caminho. No tálamo esses axônios fazem sinapses em diferentes núcleos, de onde, posteriormente sairão neurônios de terceira ordem levando informações para várias regiões do córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (Craig, 2003).

Em resposta aos estímulos nociceptivos, o organismo possui mecanismos de controle intrínseco que modulam a sensação dolorosa. O primeiro deles foi proposto por Melzack e Wall na década de 60 e denominado de *Teoria do Portão para a Dor*. Este mecanismo modula a transdução do sinal entre as sinapses dos neurônios de primeira ordem com os neurônios de segunda ordem. Segundo Melzack e Wall, neurônios de segunda ordem são excitados tanto por axônios de pequeno diâmetro, importantes para a transmissão nociceptiva, quanto neurônios de grande diâmetro, importantes para sensações de propriocepção. Os neurônios de segunda ordem também são inibidos por interneurônios, que são estimulados por fibras sensoriais grandes e inibido por fibras sensoriais pequenas. Se ocorrer estimulação somente de fibras nociceptivas pequenas, ocorre ativação direta dos neurônios de segunda ordem e o sinal nociceptivo ascende a centros superiores. Contudo, se simultaneamente ocorrer ativação de fibras grandes, ocorre a ativação do interneurônio inibitório e assim, o sinal nociceptivo é controlado (Melzack, 1999).

Além disso, existem várias regiões e estruturas que modulam mecanismos intrínsecos de controle da dor, uma das mais importantes e estudadas que oferece um controle endógeno para a via da transdução da nocicepção é a substância cinzenta periaquedutal (PAG). A PAG está localizada no tronco cerebral onde recebe e emite projeções para a medula espinhal, amígdala, córtex frontal, tálamo, hipotálamo, cerebelo, dentre outros (Coffield *et al.*, 1992; Bandler *et al.*, 1996). A estimulação elétrica da PAG causa analgesia intensa, ocorrendo principalmente pela liberação do neurotransmissor serotonina, a qual ativa interneurônios que inibem a transmissão da via espinotalâmica. O hipotálamo e a amígdala também são estruturas que participam da modulação descendente inibitória, estimulando ou inibindo sistemas como o opióide, gabaérgico, glutamatérgico, canabinóides, noradrenérgico, purinérgico, entre outros (Melzack, 1999; Millan, 1999; Hunt *et al.*, 2001).

De fato, estes mecanismos de controle endógenos da nocicepção sofrem grande interferência de situações ambientais, ou seja, em algumas ocasiões de perigo ou profunda concentração, núcleos importantes que modulam o controle endógeno da nocicepção são acionados, acarretando na liberação de neurotransmissores responsáveis pelo controle da transmissão nociceptiva, dessa forma o indivíduo pode sentir menos dor em lesões que normalmente seriam debilitantes, assim esse mecanismo de controle pode ter sido fundamental para a sobrevivência de muitas espécies, inclusive o ser humano (Beecher, 1959; Melzack, 1999).

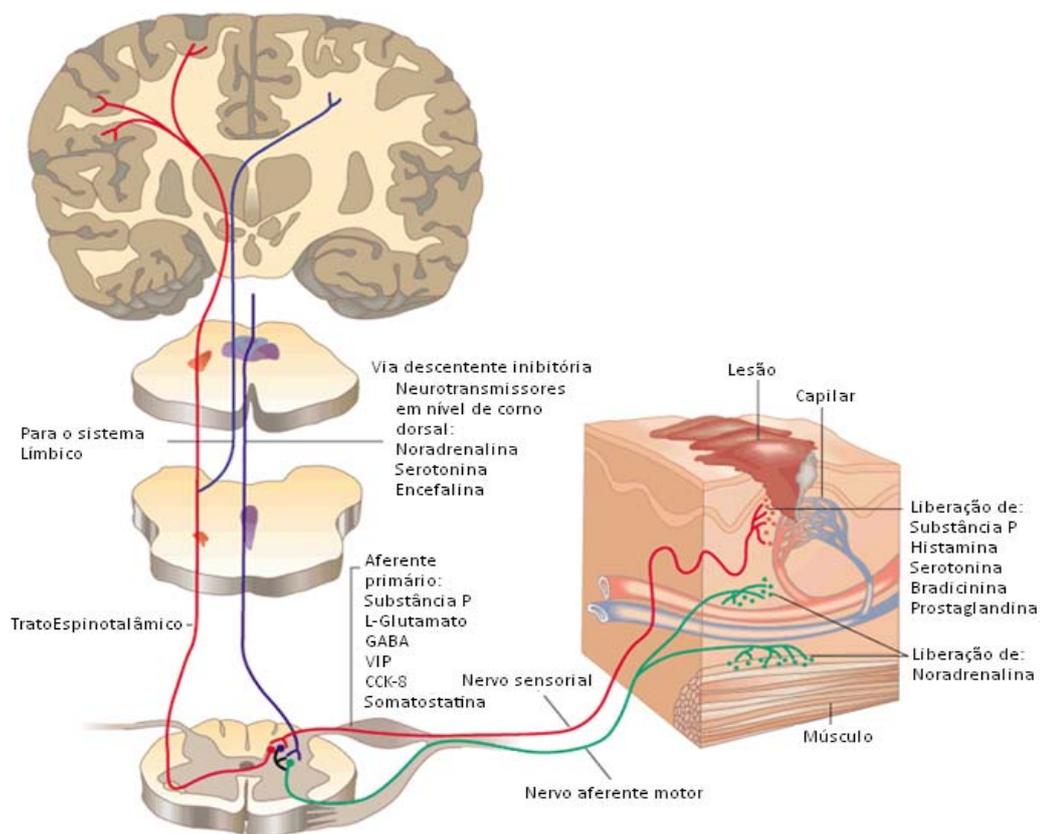


Figura 2: Percepção da dor. Após uma lesão tecidual ocorrem produção e liberação de mediadores químicos locais, como substância P, histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas. Estes mediadores ao atuarem em seus receptores podem sensibilizar ou ativar os nociceptores periféricos, gerando assim potenciais de ação que culminam na liberação de neurotransmissores como substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina (CCK-8), somatostatina no corno dorsal da medula espinhal. Estes neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem e o sinal nociceptivo ascende para regiões do sistema límbico principalmente para o tálamo, principalmente pelo trato espinotalâmico. Em resposta a estimulação nociceptiva ascendente, ocorre ativação de algumas vias descendentes de controle da nocicepção, culminando na liberação de noradrenalina, serotonina e encefalinas na região do corno dorsal medular, modulando assim o sinal nociceptivo.

1.5 Processo Inflamatório

A inflamação pode ser definida como uma resposta imunológica a danos celulares e/ou teciduais decorrentes de infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física. A resposta inflamatória é inicialmente caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular devido à liberação de vários mediadores químicos, bem como um grande recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. Essa resposta é extremamente importante para a sobrevivência do organismo afetado, pois atua em direção à eliminação de patógenos com a finalidade da manutenção da homeostase do organismo e reestruturação do tecido lesionado (Schmid-Schonbein, 2006). Contudo uma resposta desregulada acaba por prejudicar o próprio organismo.

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por cinco sinais clássicos, sensação de dor aguda, calor, vermelhidão, edema e conseqüentemente perda da função do membro afetado. Em nível tecidual ou celular a inflamação pode ser referida como uma cascata inflamatória que envolve uma sequência de eventos, como dilatação de vênulas e arteríolas, aumento na permeabilidade e no fluxo sanguíneo, infiltração de leucócitos para o local da lesão, extravasamento de proteínas plasmáticas, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (Huerre *et al.*, 1996; Vivier *et al.*, 2005).

Diferentes tipos de células participam do processo inflamatório desempenhando funções distintas, mas muitas vezes sobrepostas. O epitélio é a maior barreira de proteção frente a microorganismos. No entanto, quando esta barreira é danificada, os microorganismos ativam as células residentes como macrófagos e neutrófilos, que englobam e posteriormente degradam o agente invasor (Schmid-Schonbein, 2006). Essas células quando ativadas iniciam um processo de sinalização de vias intracelulares culminando na síntese de mediadores que participam diretamente do processo inflamatório. Uma das principais vias que podem ser ativadas é a do fator nuclear- κ B (NF- κ B), que ativa a transcrição de genes para muitas proteínas pró-inflamatórias, tais como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ,

interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12), dentre outras (Brochu *et al.*, 1999; Laflamme *et al.*, 1999; Schmid-Schonbein, 2006).

Estes mediadores produzidos e liberados são essenciais para o desenvolvimento do processo inflamatório, acarretando em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, assim como a ativação e recrutamento de mais leucócitos para o tecido inflamado. De fato, a vasodilatação é um fenômeno clássico associado à inflamação, a qual facilita a disponibilidade local de mediadores e células inflamatórias. Este processo ocorre minutos após a lesão e envolve arteríolas, capilares e vênulas, levando inicialmente a um aumento do fluxo sanguíneo local. Esse processo é primeiramente mediado pelo óxido nítrico (NO) e por prostaglandinas vasodilatadoras (Sherwood *et al.*, 2004). O NO é produzido a partir da L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), que são constitutivamente expressas, e a forma induzida (iNOS), que é produzida após a ativação de leucócitos em condições inflamatórias (Vallance *et al.*, 2001).

Um importante fenômeno atribuído à vasodilatação e ao extravasamento de fluídos em processos patofisiológicos é o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Este processo compreende etapas como a marginação, adesão ao endotélio e a migração de células. Cerca de 50 a 60 % dos leucócitos presentes na circulação sanguínea são neutrófilos (Coleman, 1994), sendo estes os primeiros e mais abundantes leucócitos a chegarem ao foco da inflamação, sendo seguidas por grande migração de células mononucleares várias horas após o início do processo inflamatório (Schmid-Schonbein, 2006).

Os eventos relacionados ao extravasamento de fluídos do plasma para o tecido e conseqüentemente formação de edema, bem como a liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios que induzem sensibilização ou ativação dos nociceptores, além da infiltração de células do processo inflamatório, podem ser mimetizados em animais de laboratório, através da utilização de substâncias químicas como a carragenina (polissacarídeo extraído de algas vermelhas) e o adjuvante completo de Freud (solução oleosa normalmente composta de *Mycobacterium tuberculosis* mortas ou inativadas) (Militzer, 1975), as quais provocam várias características clínicas e celulares relacionadas ao processo inflamatório, sendo fundamentais para o desenvolvimento de fármacos com propriedades antiinflamatórias.

1.6 Produtos Naturais

Os produtos naturais e sua utilização é tão antiga quanto a história humana, existem relatos de povos Egípcios datados cerca de 1500 anos a.C., que descrevem várias doenças e seus tratamentos utilizando produtos de origem natural. Textos de civilizações antigas como as do oriente médio, sumérios, assírios, bem como gregos e povos nativos americanos deixaram seu legado a cerca de seus conhecimentos sobre a utilização de produtos naturais para o tratamento de algumas enfermidades (Lombardino *et al.*, 2004).

Ao passar dos anos essas informações se tornaram grandes tesouros para a indústria farmacêutica, o que acarretou na identificação de princípios ativos e conseqüentemente na síntese de uma gama de medicamentos que atualmente são utilizados para o tratamento de várias doenças. Contudo, para chegar ao que se conhece atualmente acerca da síntese de substâncias ativas provenientes de produtos naturais, a ciência e a indústria tiveram grande contribuição de alguns estudiosos (Szekessy-Hermann, 1978).

Em 1828, o professor Friedrich Wohler, demonstrou em laboratório que, um produto orgânico poderia ser obtido de matéria prima inorgânica, assim, tinha-se a possibilidade de produzir compostos sintéticos através de manipulação química, utilizando produtos de origem animal e vegetal como matéria prima (Szekessy-Hermann, 1978). A indústria aperfeiçoou o método de Wohler e alguns anos após sua descoberta já era possível conjugar moléculas inorgânicas com compostos orgânicos. Um exemplo disso é a síntese do ácido acetil-salicílico (AAS). O ácido salicílico é o precursor do ácido acetil-salicílico e é extraído da casca do salgueiro (*Salix Alba*), em seguida é conjugado quimicamente com um acetato, formando o AAS, tornando-se um dos medicamentos mais utilizados na história humana (Levesque *et al.*, 2000; Lombardino *et al.*, 2004).

Cem anos após a descoberta de Wohler, o médico Alexander Fleming foi responsável por outro importante divisor de águas para a indústria farmacêutica, descobrindo um produto bioativo derivado de fungos. Ele observou que placas de culturas de *Staphylococcus*, quando contaminadas com um bolor, provocava a morte

dessas bactérias. Posteriormente, Fleming descobriu que esses fungos, do gênero *Penicillium* produziam uma substância bactericida que ele denominou de penicilina. Alguns anos mais tarde, Howard Florey e Ernst Chain conseguiram purificar a substância, comprovando os resultados de Fleming. A penicilina ajudou a salvar muitas vidas e é um dos antibióticos mais utilizados atualmente na clínica (Bentley, 2005). Desde então, tem se pesquisado acerca de vários produtos naturais. De fato, a descoberta que certas plantas tinham um caráter medicinal, levou a indústria a isolar alguns compostos, como a morfina e a codeína da *Papaver somniferum* L., a digoxina da *Digitalis lanata* Ehrhart., a atropina e a hioscina de espécies do gênero *Solanaceae* que ainda hoje são muito utilizadas na clínica (Phillipson, 2001).

Como já descrito, o tratamento e a cura de muitas doenças através da utilização de plantas vêm sendo feita ao longo da história. Ainda hoje, em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas (Maciel, 2002). Atualmente, cerca de 25-30% de todos os remédios utilizados na terapêutica são de origem natural, seja elas derivados de plantas, microorganismos e animais ou como precursores de alguns compostos. Além disso, o Brasil tem uma das maiores biodiversidade do mundo, possuindo cerca de 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes no planeta (Calixto, 2005). Alguns trabalhos vêm mostrando importantes resultados acerca da utilização de produtos naturais em diferentes patologias (Butler, 2004; Gullo *et al.*, 2006). Embora, plantas medicinais sejam muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos, o conhecimento agregado perante toda essa biodiversidade ainda é pequeno (Maciel, 2002; Calixto, 2005).

Apesar de a medicina convencional ter superado muitas dessas terapias, ressurgiu nos últimos anos um grande interesse, especialmente pela indústria farmacêutica, em examinar os potenciais recursos dos produtos naturais pelos efeitos medicinais que produzem (Zhang *et al.*, 2001). Dessa forma, a indústria tem se voltado ao conhecimento popular a fim de adquirir informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Ressurgindo das pequenas comunidades, a cultura medicinal tem despertado também o interesse de pesquisadores, em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial, sendo um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (Maciel, 2002).

1.7 Alfa e beta-amirina

As plantas pertencentes à família das Burseraceae, que compõem o gênero *Protium* (ex. *Protium kleinii*, *Protium heptaphyllum*) são comumente utilizadas na medicina popular brasileira, principalmente como curativo para úlceras e tratamento de condições inflamatórias (Corrêa, 1984). Trabalhos mostram que o óleo essencial extraído das folhas e da resina de plantas pertencentes ao gênero *Protium*, apresentam alguns importantes constituintes, como os monoterpenos e fenilpropanoides (Siani *et al.*, 1999). Além disso, estudos fitoquímicos do óleo essencial e do extrato dessas plantas, destacaram também a presença de uma série de triterpenos pentacíclicos, dentre eles uma mistura de dois isômeros, a α -amirina e a β -amirina (Recio *et al.*, 1995; Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Soldi *et al.*, 2007), apresentados na figura 3.

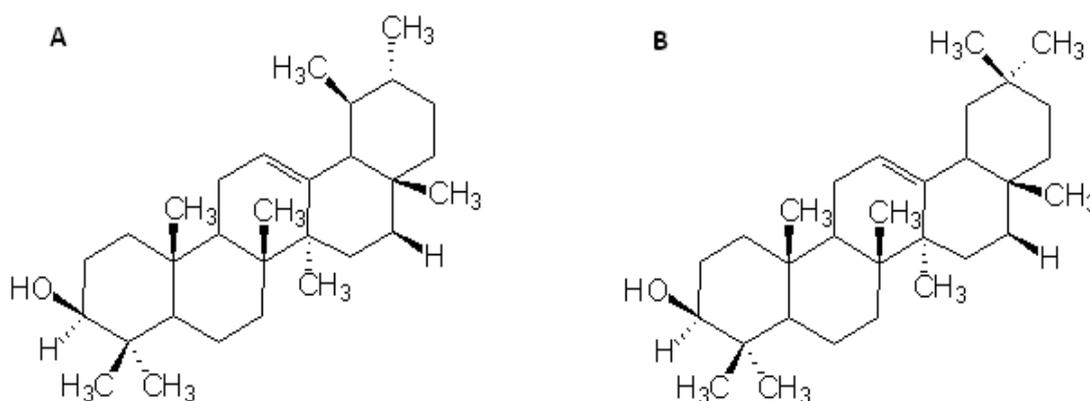


Figura 3: Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos, α -amirina (A) e β -amirina (B).

Além das características antiinflamatórias popularmente conhecidas da resina das plantas do gênero *Protium*, uma variedade de outros efeitos tem sido descritos na literatura, que incluem propriedades gastroprotetoras, hepatoprotetoras, cardioprotetoras, antioxidante, bactericida, antialérgicas, antitumorais, antivirais, ansiolíticas, antidepressivas e antinociceptivas, sendo estes efeitos atribuídos aos triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina presentes nessa resina (Oliveira *et*

al., 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005; Aragao *et al.*, 2006).

Recentemente, tem-se demonstrado que os triterpenos α e β -amirina apresentam atividade antiinflamatória em modelos de edema de pata induzido pela carragenina e dextrana em camundongos (Aragao *et al.*, 2007) e edema de orelha induzido por vários agentes pró-inflamatórios (Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005; Medeiros *et al.*, 2007), bem como foi eficaz em reduzir os níveis de MPO e TNF- α na periodontite induzida pela ligadura do dente (Holanda Pinto *et al.*, 2008). Além disso, esses triterpenos quando administrados pelas vias sistêmica, espinhal e supra-espinhal apresentaram significativo efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória e estes efeitos tem sido atribuídos à capacidade da α e β -amirina em interferir com a via de duas proteínas, a proteína quinase, a PKA e a PKC (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005).

Contudo, outros mecanismos foram propostos, com base em alguns experimentos nos quais foi demonstrado que os triterpenos α e β -amirina reduzem a nocicepção visceral induzida pela administração intracolônica de capsaicina ou óleo de mostarda, bem como pela administração intraperitoneal de ciclofosfamida. Desta forma, acredita-se que os triterpenos α e β -amirina possam interagir com receptores opióides e vanilóides (TRPV1), bloquear a liberação de substância P, além de facilitar a abertura de canais de potássio dependentes do ATP e suprimir a expressão da enzima COX-2, talvez por bloqueio da ativação do fator nuclear kappa-B (Oliveira *et al.*, 2005; Lima-Junior *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007).

1.8 Octanoato de alfa e beta-amirina

Como descrito anteriormente, existe uma variedade de informações a respeito das atividades químicas e farmacológicas dos triterpenos α e β -amirina, porém, pouco se conhece a respeito da estrutura-atividade de compostos quimicamente relacionados e derivados dessas moléculas. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura relata algumas modificações estruturais de outros triterpenos encontrados nas plantas do gênero *Protium*, como o ácido oleanólico e o ácido ursólico (Chadalapaka *et al.*, 2008; Gnoatto *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008; Tanachatchairatana *et al.*, 2008).

Os triterpenos estão presentes em uma variedade de produtos naturais e apresentam diversas atividades biológicas, contudo, na grande maioria dos casos a potência desses triterpenos é relativamente fraca (Honda *et al.*, 2000). Desta forma, alterações estruturais na molécula original, como a realizada nos triterpenos α e β -amirina, podem alterar as propriedades físico-químicas da molécula, como a hidrofobicidade, densidade eletrônica, e propriedades farmacocinéticas, podendo acarretar em alteração na potência e atividade do composto (Honda *et al.*, 2000; Soldi *et al.*, 2007).

Recentemente, foram realizados dois trabalhos mostrando modificações estruturais nos triterpenos α e β -amirina, bem como a relação estrutura-atividade, nesses estudos foi demonstrado que apenas alguns derivados obtiveram resultados significativos no que diz respeito à atividade antifúngica. Dentre os que se destacam está o formiato de α e β -amirina, sendo o mais efetivo em inibir a adesão de *Candida albicans* nas células epiteliais bucais (Johann *et al.*, 2007). Em relação ao efeito antinociceptivo, o formiato de α e β -amirina não obteve importante resultado, porém, outro derivado denominado de octanoato de α e β -amirina (figura 4) demonstrou significativo efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção induzidos pelo ácido acético e pela formalina em camundongos (Soldi *et al.*, 2007). Além disso, foi mais potente que seu precursor α e β -amirina nestes modelos de nocicepção.

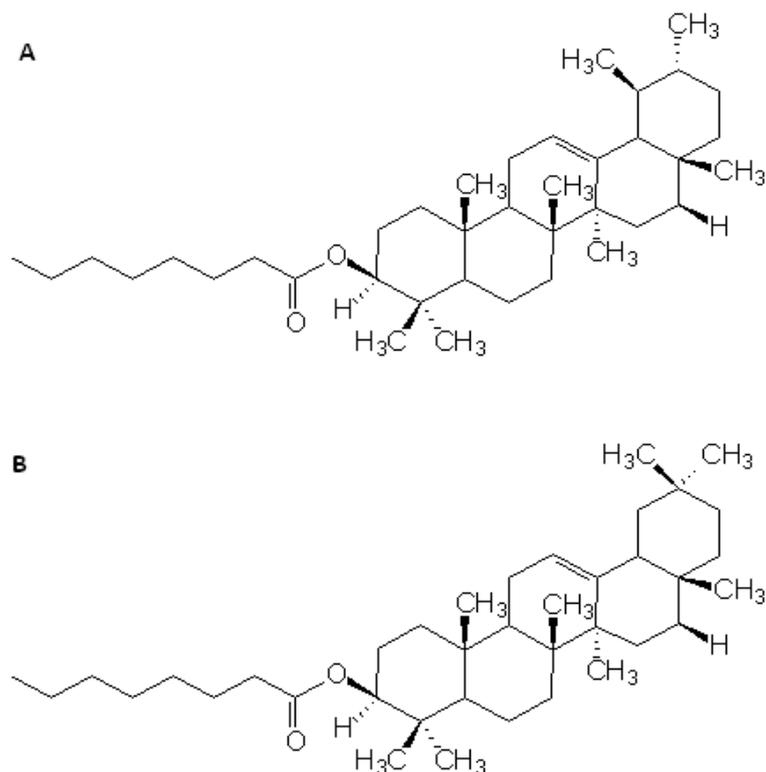


Figura 4: Estrutura química dos dois triterpenos pentacíclicos, octanoato de α -amirina (A) e octanoato de β -amirina (B).

Desta forma, este trabalho visa ampliar o conhecimento a respeito do efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, em modelos de nocicepção térmicos, químicos e mecânicos em camundongos e ratos. Além disso, avaliar também seu possível efeito antiinflamatório, em modelos de inflamação induzidos por agentes químicos, bem como delinear um possível mecanismo de ação.

Objetivos

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo do presente trabalho foi investigar o possível efeito antinociceptivo e antiinflamatório do octanoato de α e β -amirina e seu provável mecanismo de ação, utilizando antagonistas seletivos, técnicas farmacologias e bioquímicas.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina em modelos químicos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, glutamato, e capsaicina em camundongos;
- Investigar a influência dos sistemas: opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e colinérgico na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos;
- Investigar o papel das fibras C sensíveis a capsaicina e da proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina Pertussis na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos;
- Investigar a participação do receptor TRPV1 no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina em camundongos;

- Analisar o possível efeito do octanoato de α e β -amirina sobre a hiperalgesia térmica e mecânica em ratos;
- Investigar a participação da PKC no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina em camundongos;
- Avaliar o possível efeito antiinflamatório do octanoato de α e β -amirina no modelo de edema de pata e pleurisia induzidos pela carragenina em camundongos;
- Investigar alguns mecanismos relacionados ao efeito antiinflamatório do octanoato de α e β -amirina, como a migração celular e a produção de citocinas IL-1 β e o TNF- α ;
- Verificar o efeito do octanoato de α e β -amirina sobre o desempenho e atividade locomotora teste do rota-rod e campo aberto, bem como verificar a temperatura corporal de camundongos.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss de ambos os sexos (25 a 35 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 6:00h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (Zimmermann, 1983). Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº PP00176). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos.

3.2 Síntese do octanoato de α e β -amirina

A síntese do octanoato de α e β -amirina foi realizada de acordo com os procedimentos anteriormente descritos por Soldi e colaboradores (2007). Assim, foi pesado 156,6 mg da mistura de α e β -amirina, contendo a proporção de 34% de α -amirina e 66% de β -amirina e dissolvido em 5 ml de piridina, em seguida essa mistura foi tratada com solução equimolar contendo 0,1 ml de cloridrato de octanoil. A mistura foi aquecida e monitorada por cromatografia de camada delgada (TLC, do inglês *thin-layer chromatography*, SiO₂) utilizando uma mistura de hexano/etilacetato (95:5 v:v), até todos os substratos serem consumidos. Logo após a dissolução dos produtos, uma solução aquosa de ácido clorídrico foi adicionada a mistura. O produto foi extraído com triclorometano e lavado com solução saturada de NaHCO₃,

em seguida foi seco com solução anidra de Na_2SO_4 e purificada por cromatografia em sílica gel (SiO_2) utilizando a solução de hexano/etilacetato para obter a mistura do octanoato de α e β -amirina, sendo esta inseparável. O produto purificado obtido foi caracterizado como sólido amorfo branco, sendo obtidos 85% de rendimento nesta reação. IR (KBr pellet): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1729 (C=O); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico de triterpenos), 2,30 (t, $J = 7,6$ Hz, H-2'), 4,51 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado da β -amirina), 5.19 (m, H-12 do derivado da α -amirina); GC [r.t. min]: 40,1 (34 %) octanoato de α -amirina 43,1 (66 %) de octanoato de β -amirina. O peso molecular do octanoato de α e β -amirina é 551,90 g/mol.

3.3 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Inicialmente foi verificado o efeito do octanoato de α e β -amirina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. Embora a especificidade do modelo não seja alta, ele ainda é um dos meios mais utilizados para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos de extratos e compostos isolados (Koster, 1959). O ácido acético foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%), sendo utilizado uma concentração de (0,6%). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético (0,6%), provocando fortes contorções abdominais, as quais consistem na contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (Koster, 1959; Collier *et al.*, 1968). Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimação, em seguida, grupos de animais foram pré-tratados com octanoato de α e β -amirina pela via intraperitoneal (i.p.) (0,0001–0,1 mg/kg) ou pela via oral (v.o.) (1-30 mg/kg), 30 ou 60 min antes da realização dos experimentos, respectivamente. Os grupos controles foram tratados com veículo (10 ml/kg). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro e o número de contorções

abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005). Em outra série de experimentos foi avaliada a duração do efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina. Para este fim, os animais receberam octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) e transcorrido o tempo de 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 e 24h após a administração, os animais receberam ácido acético (0,6%, i.p.) e o número de contorções abdominais foi avaliada conforme descrito anteriormente.

3.4 Nocicepção induzida pela formalina

Para confirmação e melhor compreensão do efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina. Esse é um modelo que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (Hunskaar *et al.*, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992). O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito por Santos e Calixto (1997a). Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimação, em seguida, foram tratados com octanoato de α e β -amirina (0,1 – 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois receberam 20 μ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de formalina, os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a injeção de formalina. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção.

3.5 Nociceção induzida pelo glutamato

O glutamato (Glu) é um dos neurotransmissores mais envolvidos na sensação nociceptiva e antinociceptiva (Riedel *et al.*, 2001). Os receptores glutamatérgicos estão presentes tanto em fibras nociceptivas periféricas, quanto centrais e modulam a ação de várias substâncias envolvidas no processo doloroso (Fundytus, 2001). A administração intraplantar de Glu causa ativação direta dos nociceptores, liberação de mediadores inflamatórios, neuropeptídeos, e do próprio glutamato, em terminais periféricos e centrais (Beirith *et al.*, 2003). Dessa forma, este modelo visa avaliar substâncias que possam interagir com este sistema (Beirith *et al.*, 2002). Com este objetivo, foi analisada a possível modulação do octanoato de α e β -amirina sobre o sistema glutamatérgico, empregando o procedimento similar ao descrito por Beirith e colaboradores (2002). Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimatação, em seguida, foram tratados com octanoato de α e β -amirina (0,001 – 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois, receberam um volume de 20 μ l de glutamato (20 μ mol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de glutamato os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados individualmente, sendo cronometrado o tempo em que o animal lambia ou mordia a pata injetada por um período de 15 min, sendo este tempo considerado um indicativo de nociceção.

3.6 Nociceção induzida pela capsaicina

A capsaicina é um princípio ativo extraído da pimenta e proporciona a ativação direta dos nociceptores, através da estimulação de receptores do tipo TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997). A ativação do TRPV1 presente em nociceptores provoca a liberação de neuropeptídeos nos terminais periféricos e centrais o que contribui para a dor neurogênica. Sendo assim, este modelo proposto por Sakurada e colaboradores (1992), visa avaliar substâncias que possam modular a ação, tanto do receptor TRPV1, quanto de neuropeptídeos. O procedimento experimental utilizado

foi similar ao descrito previamente (Santos *et al.*, 1997b; Andrade *et al.*, 2008). Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimação, em seguida, foram tratados com octanoato de α e β -amirina (0,001 – 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois foi injetado um volume de 20 μ l de capsaicina (0,1 nmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção de capsaicina os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados individualmente, sendo cronometrado o tempo em que o animal lambia ou mordia a pata injetada por um período de 5 min, sendo este tempo considerado um indicativo de nocicepção.

3.7 Resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de glutamato, substância P e capsaicina

Para explorar evidências mais diretas a respeito da interação entre o octanoato de α e β -amirina e o sistema glutamatérgico, substância P (SP) e os receptores TRPV1, presentes no sistema nervoso central, glutamato (Glu), SP e Capsaicina (Cap) foram administrados intratecalmente (i.t.). O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito previamente por Meotti e colaboradores (2007). As substâncias foram administradas nos animais conforme o método descrito anteriormente (Hylden *et al.*, 1980). Os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 50 μ l foi inserida através da pele, entre as vértebras L5 e L6, no espaço subdural. Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimação, em seguida, foram tratados com octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois foram administradas injeções i.t. de Glu (175 nmol/sítio), SP (100 pmol/sítio) ou Cap (100 pmol/sítio), diluídos em solução salina. Após a injeção do Glu, SP ou Cap os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observado o tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo os membros inferiores (patas posteriores, cauda e abdômen), sendo cronometrado durante o período de tempo padronizado (Glu: 3 min; SP: 6 min e Cap: 6 min). Este tempo foi

considerado como índice de nocicepção, conforme descrito previamente por Meotti e colaboradores (2007).

3.8 Envolvimento do receptor TRPV1

Para verificar uma possível modulação entre o octanoato de α e β -amirina e os receptores TRPV1 presentes na periferia, os animais foram submetidos ao procedimento previamente descrito (Sakurada *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2008), com algumas modificações. Primeiramente, os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimatação, em seguida, foram pré-tratados intraplantarmente (i.pl.), na superfície ventral da pata direita, com 10 μ l de capsazepina (antagonista seletivo dos receptores TRPV1, 1 nmol/pata), octanoato de α e β -amirina (1,8 nmol/pata) ou veículo. Depois de 5 min um volume de 10 μ l contendo capsaicina (0,1 nmol/pata) foi administrado nas patas previamente tratadas. O volume total administrado na pata correspondeu a 20 μ l. Após a administração de capsaicina, os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados por um período de 5 min. O tempo em que o animal ficou lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado com indicativo de nocicepção (Andrade *et al.*, 2008).

3.9 Estudo do Mecanismo de Ação

De acordo com os resultados obtidos nos modelos de nocicepção descritos anteriormente, a próxima etapa deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina. Com esse objetivo, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Em todos os experimentos subsequentes os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h antes do início dos experimentos para devida aclimatação. As doses das drogas utilizadas

foram selecionadas com base em dados da literatura e também baseados em resultados prévios do laboratório (Santos *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2008). O octanoato de α e β -amirina foi administrado 30 min antes dos testes na dose de 0,1 mg/kg, i.p.

3.9.1 Envolvimento das fibras sensíveis a capsaicina

Para explorar o papel das fibras sensíveis a capsaicina no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, camundongos foram tratados com 50 mg/kg de capsaicina pela via subcutânea (s.c.) no segundo dia de vida. Este tratamento tem por objetivo causar degeneração de neurônios aferentes primários, principalmente fibras do tipo C e A δ que expressam o receptor TRPV1 (Holzer, 1991). Animais controles receberam pela via subcutânea (s.c.) o mesmo volume do veículo em que foi dissolvido a capsaicina (5% etanol, 5% Tween 80, e 90% salina). O efeito do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), foram avaliados através da resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético, como previamente descrito, após a 6 e 7 semanas do tratamento neonatal com veículo ou capsaicina. A eficiência do tratamento com capsaicina neonatal foi confirmado pelo número de movimentos de coçar o olho “eye wiping” após a administração de 50 μ l de capsaicina (0,01%) no olho direito do animal. A quantidade de vezes em que o animal coçou o olho foi avaliada por um período de 1 min, como anteriormente descrito (Ikeda *et al.*, 2001).

3.9.2 Envolvimento da proteína G sensível a Toxina Pertussis

Com a intenção de verificar participação da proteína Gi/o na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina, animais foram pré-tratados com toxina pertussis, substância capaz de causar inativação da subunidade catalítica da proteína Gi/o. O procedimento foi similar ao descrito por Santos e colaboradores (1999), com algumas modificações. Camundongos foram pré-tratados com toxina

pertussis (2,5 µg/sítio, i.t.) ou solução salina (5 µl/site, i.t.) 7 dias antes da administração do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Transcorridos 30 min, os animais foram avaliados no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005).

3.9.3 Envolvimento do sistema opióide

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, camundongos foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo dos receptores opióides) ou solução salina (10 ml/kg i.p.), após 20 min esses animais receberam octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.), morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva foi avaliada 30 min após a administração de octanoato de α e β -amirina, morfina ou veículo, através da injeção i.p. de ácido acético, como previamente descrito. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificada durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005).

3.9.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Com a intenção de verificar a possível contribuição do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, os animais foram pré-tratados com o p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., um inibidor da enzima triptofano hidroxilase) ou solução salina (10 ml/kg i.p.), uma vez ao dia por um período de 4 dias, a fim de reduzir os níveis de serotonina endógena. Depois de 20 min do último tratamento com PCPA ou salina, os animais receberam octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.), morfina (2,5 mg/kg s.c.) ou veículo (10 ml/kg i.p.). A resposta nociceptiva foi avaliada 30 min após a administração de octanoato de α e β -amirina, morfina ou veículo, através da injeção i.p. de ácido

acético, como previamente descrito. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificada durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005).

3.9.5 Envolvimento do sistema α_2 -adrenérgico

Em seguida, foi avaliado o possível papel dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina. Para isto, camundongos foram pré-tratados com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos) ou solução salina (10 ml/kg i.p.), depois de 20 min os animais receberam octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p., um agonista seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva foi avaliada 30 min após a administração de octanoato de α e β -amirina, clonidina ou veículo, através da injeção i.p. de ácido acético, como previamente descrito. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificada durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005).

3.9.6 Envolvimento do sistema colinérgico

Para avaliar a possível participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, camundongos foram pré-tratados com mecamilamina (2 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo dos receptores nicotínicos $\alpha_2\beta_3$), atropina (1 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo dos receptores muscarínicos) ou salina (10 ml/kg, i.p.), depois de 20 min esses animais receberam octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg i.p.), nicotina (1 mg/kg, i.p. um agonista seletivo dos receptores nicotínicos), pilocarpina (3 mg/kg, i.p. um agonista seletivo dos receptores muscarínicos) ou veículo do octanoato de α e β -amirina (10 ml/kg i.p.), a resposta nociceptiva foi avaliada 30 min após a administração de octanoato de α e β -amirina, nicotina, pilocarpina ou veículo, através da injeção i.p. de ácido acético, como previamente descrito. O número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificada durante um período de 20 min (Santos *et al.*, 2005).

3.9.7 Hiperalgisia térmica e mecânica induzida por PGE₂, BK e PMA

A estimulação térmica na pata do animal foi conduzida de acordo com o método anteriormente descrito por Hargreaves e colaboradores (1988), em ratos. Os ratos foram ambientados em caixas de acrílico por um período de 1h antes do início dos experimentos. A estimulação térmica foi gerada por uma lâmpada infravermelha presente no aparelho (Ugo Basile, Varese, Itália), sendo focalizada no meio da superfície ventral da pata direita. O tempo decorrente entre o começo do estímulo e a manifestação da resposta de retirada de pata foi automaticamente cronometrado e utilizado como um índice do limiar de nocicepção. Diminuições significantes de latência de retirada da pata foram interpretadas como indicativo de hiperalgisia ao calor. O aparelho foi desligado após um período de 20 segundos de estimulação, para evitar danos teciduais no animal.

O limiar de hiperalgisia mecânica (resposta de vocalização ou retirada da pata) foi avaliado aplicando uma pressão crescente na superfície dorsal da pata em que foi administrado o agente flogístico ou veículo. Para isto foi utilizado o aparelho de medida de analgesia Ugo Basile (Ugo Basile, Varese, Itália) de acordo com o método descrito por Randall e Selitto (1957). O aparelho produz pressão crescente que pode variar entre 0 e 750 g. A resposta hiperalgésica foi analisada em função da capacidade do rato em suportar a pressão exercida pelo aparelho em sua pata.

O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por Lucena e colaboradores (2007). Os ratos foram pré-tratados com octanoato de α e β -amirina (0,1 - 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de 100 μ l de prostaglandina E₂ (PGE₂, 10 nmol/pata), bradicinina (BK, 3 nmol/pata), acetato de miristato de forbol (PMA, 0,1 nmol/ pata) ou somente solução salina (grupo controle), na superfície ventral da pata direita, em seguida foram avaliados nos modelos previamente padronizados por (Hargreaves *et al.*, 1988) e (Randall *et al.*, 1957). Cerca de 60 min antes da administração de BK, os animais foram pré-tratados com captopril (5 mg/kg, s.c., um inibidor da enzima conversora de angiotensina) para prevenir a degradação da BK (De Campos *et al.*, 1997).

3.9.8 Nocicepção induzida pelo PMA

A fim de verificar se o octanoato de α e β -amirina modula a ação da PKC, foi investigado seu efeito sobre a nocicepção induzida pelo PMA (ativador de PKC) em camundongos. Os experimentos foram realizados como previamente descrito por Ferreira e colaboradores (2005), com algumas modificações. Os animais utilizados foram individualmente colocados em funis de vidro e mantidos por um período de 1 h para sua aclimação. Em seguida, os animais foram pré-tratados com octanoato de α e β -amirina (3 – 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min após receberam 20 μ l de PMA (500 pmol/pata) na superfície ventral da pata direita. Após a injeção do PMA os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados por um período de 15 a 45 min, sendo que a quantidade de tempo em que o animal ficou lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado com indicativo de nocicepção.

3.9.9 Preparação dos extratos citosólicos e nucleares

A fim de verificar se o octanoato de α e β -amirina altera a ativação da PKC ϵ , a superfície ventral da pata foi coletada após 15 min da administração intraplantar de PMA (animais tratados com salina, animais tratados com octanoato de α e β -amirina e também de animais não manipulados: naive). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com processador de tecidos (*Tissue tearor*, Biospec Products, INC., OK, EUA) em tampão de lise A gelado [Tampão A: HEPES 10 mM (pH 7,9), contendo: 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 0,5 mM de ditioneitol (DTT), 50 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, 1,5 μ g/ml de inibidor de tripsina, 7 μ g/ml de pepstatina A, 5 μ g/ml de leupeptina e 10 μ g/ml de aprotinina, incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm, 60 min, 4 °C. O sobrenadante resultante coletado correspondeu ao extrato citosólico. Para obtenção das proteínas de membrana, o pellet foi re-suspenso em tampão de lise A contendo 1 % de triton-X 100, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm, 30 min, 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado como extrato rico em membrana. A

concentração de proteínas das amostras foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad *Protein Assay Kit*) segundo recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer a -70 °C até o momento do uso.

3.9.10 Western Blot

Aproximadamente 50 µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, contendo: β-mercaptoetanol 15 %, SDS 6 % e azul de bromofenol 0,3 %), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 %. Em seguida, as proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para membranas de polivinilideno difluorido (PVDF). Para bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas overnight em solução de TBS-T contendo leite desnatado (5 %) a 4 °C, lavadas em tampão TBS-T e então incubadas overnight com os anticorpos primários anti-PKCε (1:500, Santa Cruz Biotech. Inc., CA, USA) ou β-tubulina (1:500; controle). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.10 Avaliação da Atividade Antiinflamatória

3.10.1 Avaliação da atividade antiedematogênica do octanoato de α e β -amirina no modelo de edema de pata

O modelo de edema em pata em camundongos foi realizado de acordo com Passos e colaboradores (2007). O volume da pata direita e esquerda dos animais foi avaliado por pletismometria. Em seguida, os animais receberam o tratamento com octanoato de α e β -amirina (0,1 - 10 mg/kg, i.p.), indometacina (Ind, 4 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/Kg, i.p.) e após 30 min foi realizada a administração i.pl. de carragenina (Cg, 300 μ g/pata), na região ventral da pata direita e salina na região ventral da pata esquerda, no volume de 20 μ l. Os volumes das patas traseiras direita e esquerda foram avaliados novamente por pletismometria nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 24h após a administração de Cg. Os resultados foram expressos em microlitros, obtidos pela diferença entre o volume da pata direita (Vd) e o volume da pata esquerda (Ve), representados pela fórmula Vd-Ve, a cada tempo. Ao final da quarta hora da administração de Cg, alguns animais de cada grupo foram sacrificados e a superfície da pata direita em que foi administrado a Cg foi retirada. Em seguida, os tecidos foram colocados em tubos plásticos e acondicionados em freezer -70°C para posterior análise.

3.10.2 Avaliação da atividade antiinflamatória do octanoato de α e β -amirina no modelo de pleurisia

Para indução experimental da pleurisia, os camundongos foram levemente anestesiados com isoflurano e em seguida foi administrado por via endovenosa (e.v) a solução de azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml) para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural (Saleh *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2006). Após 60 min da injeção do azul de Evans, grupos de animais foram tratados com octanoato de α e β -amirina (0,1 - 10 mg/kg, i.p.), dexametasona (dex, 1 mg/kg, s.c.)

ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 0,5, 2 e 0,5 h após os tratamentos, respectivamente, foi administrado 0,1 ml de Cg (1%) diluída em salina, ou somente salina (grupo controle), na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal. Quatro horas após a administração do agente inflamatório, os animais foram sacrificados com uma overdose de CO₂. A seguir os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30 a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Em seguida o apêndice xifóide foi pinçado e através de uma incisão abaixo do esterno, os pulmões e a cavidade pleural foram expostos. Logo após esta operação, a cavidade pleural foi lavada com 1,0 ml de solução salina heparinizada (20 UI/ ml). A seguir, o volume líquido da cavidade pleural foi coletado com auxílio de pipetas automáticas e processado para posterior determinação do número total e diferencial de células e exsudação. Além disso, os pulmões foram coletados, acondicionados em tubos plásticos e mantidos em freezer -70°C, para posterior análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (Mariotto *et al.*, 2008).

A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer espelhada e microscópio óptico (aumento de 400 vezes), com uma diluição prévia de 10 µl do exsudato em 190 µl do líquido de Türk (2% de ácido acético). Com o auxílio de citocentrífuga, as amostras do exsudato pleural foram fixadas em lâminas de vidro, secadas a temperatura ambiente e então coradas pelo método de May-Grunwald-Giensa. A contagem diferencial foi feita em microscópio óptico comum com auxílio de objetiva de imersão, contando-se um total de 100 células por lâmina.

Após a lavagem das cavidades pleurais com solução salina heparinizada, uma alíquota de 500 µl foi separada, sendo determinados os níveis de azul de Evans em espectrofotômetro (Apollo LB 912-Berthold) por leitura de densidade óptica, em comprimento de onda de 600 nm. Para tal, curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em µg/ml com auxílio de regressão linear.

3.10.3 Ensaio de mieloperoxidase

A infiltração de neutrófilos foi avaliada indiretamente pela medida da atividade da enzima MPO, como previamente descrito por Bradley e colaboradores (1982). Os experimentos foram executados com as amostras da pata e do pulmão coletadas 4 horas após a administração de Cg. Os tecidos da pata e do pulmão foram homogeneizados em tubos contendo solução de 0,75 ml de solução fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) e 0,5% de hexadeciltrimetil amônio (HTAB). A reação produzida foi determinada utilizando um leitor de ELISA na absorvância de 650 nm, com um coeficiente de absorção molar de $3,9 \times 10^4$ do sal 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB). Os resultados foram expressos por densidade ótica por miligrama de tecido.

3.10.4 Dosagem de IL-1 β e TNF- α da pata

Os níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α foram avaliados como descrito anteriormente por Campos e colaboradores (2002), com poucas modificações. Os experimentos foram executados com as amostras da pata coletadas após 4 horas da administração de Cg, sendo homogeneizadas com PBS contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsufonil 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 10 min a 4 °C. Os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α foram determinados utilizando-se kits específicos de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos por densidade ótica por miligrama de tecido.

3.11 Medida do desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal

Para avaliar se o OA causava efeitos não específicos, tais como relaxamento muscular ou sedação, camundongos foram submetidos a testes como o Rota-rod

(Sanchez-Prieto *et al.*, 1996) e o teste do campo aberto (Rodrigues *et al.*, 2002). O aparelho de Rota-rod consiste em uma barra com diâmetro de 2,5 cm, subdivididos em quatro compartimentos de 25 cm de diâmetro. A barra gira a uma velocidade constante de 17 rotações por minuto. Os animais foram selecionados 24 h antes, através de um treinamento, sendo que os camundongos que não permaneceram na barra por um período de 120 segundos não participaram dos testes posteriores. Os animais foram tratados com octanoato de α e β -amirina (10 e 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 min antes do início dos testes. Os resultados foram expressos como o tempo (s) pelo qual os animais permaneceram no Rota-rod. O tempo limite foi de 120 segundos.

O modelo do campo aberto tem importante valor para testar agentes farmacológicos que produzem depressão do sistema nervosa central. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Rodrigues e colaboradores (2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O chão da caixa foi dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com todas as patas foi contado por um período de 6 min. Camundongos foram tratados com octanoato de α e β -amirina (10-30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois foram avaliados no aparato do campo aberto. Além disso, alguns componentes causam antinocicepção por diminuir a temperatura corporal (hipotermia). Para excluir esta possibilidade, foi avaliado a temperatura corporal dos animais 30 min após a administração de octanoato de α e β -amirina (10 – 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). O termosensor (Mallory Ltda., Ceará, Brasil) foi colocado na pele da região sacral e a temperatura foi medida conforme descrito nas instruções do aparelho.

3.12 Drogas e Reagentes

O octanoato de α e β -amirina foi sintetizado pelo MSc. Cristian Soldi (Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil), como descrito anteriormente (Soldi *et al.*, 2007). O ácido acético foi obtido da F. Maia. (São Paulo, Brasil). O Cloridrato de sódio foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O Formaldeído e o Tris-HCl foram obtidos da Merck (Darmstadt,

Alemanha). O β -mercaptoetanol e azul de bromofenol foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido). Hidrocloridrato de morfina foi adquirido da Cristália (São Paulo, Brasil). O ácido L-glutâmico, hidrocloridrato de naloxona, toxina pertussis da *Bordetella pertussis*, éster de etil DL-p-clorofenilalanina, carragenina- λ , hidrocloridrato de ioimbina, sulfato monohidratado de atropina, hidrocloridrato de pilocarpina, hidrocloridrato de mecamilamina, substância P, bradicinina, prostaglandina E₂, acetato de miristato de forbol, tween 80, hexadeciltrimetil amônio (HTAB), dexametasona, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Tween 20 e 80, EDTA, aprotinina, eosina, hematoxilina, tetrametilbenzidina (TMB), O-fenilenediamina (OPD), ortovanadato de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (St. Louis, EUA); A (E)-capsaicina (1S,3R), capsazepina, hidrocloridrato de clonidina e nicotina foram adquiridos da Tocris Bioscience (Ellisville, Missouri, EUA). Os kits de ELISA para TNF- α e IL-1 β foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Os anticorpos secundários Envision Plus, streptavidina e 3,3-diaminobenzidina foram adquiridas da Dako Cytomation (Carpinteria, EUA). As drogas foram dissolvidas em solução de 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). O ácido L-glutâmico foi dissolvido em solução tampão fosfato (PBS). A capsaicina foi dissolvida em 5% de etanol 5% Tween 80 em salina. O octanoato de α e β -amirina foi dissolvido em 5% de Tween 80 em salina.

3.13 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI₅₀ (doses de octanoato de α e β -amirina que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI₅₀ foram obtidos através do método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA). Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de *Newman-Keuls* ou *teste-t* quando apropriado. Os dados do tratamento do octanoato de α e β -amirina ao longo do tempo foram analisados utilizando ANOVA de duas

vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Em todos dos casos, foi considerado diferença significativa quando o $P < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Nociceção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 5 mostram que o octanoato de α e β -amirina (OA), administrado tanto pela via i.p. (0,0001 – 0,1 mg/kg, A) quanto pela v.o. (1 – 30 mg/kg, B), reduziu de maneira significativa e dependente da dose, o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI_{50} (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 0,003 (0,001-0,005) e 7,15 (5,94–8,60) mg/kg e inibições de $85 \pm 5\%$ e $72 \pm 9\%$, para a via i.p. e v.o., respectivamente. Desta forma, o octanoato de α e β -amirina foi mais potente em inibir a nociceção induzida pelo ácido acético quando administrado pela via intraperitoneal do que quando administrado pela via oral. Além disso, os resultados apresentados na figura 2C mostram que o octanoato de α e β -amirina produziu efeito antinociceptivo máximo aos 30 min, sendo mantido por até 8 h após sua administração intraperitoneal.

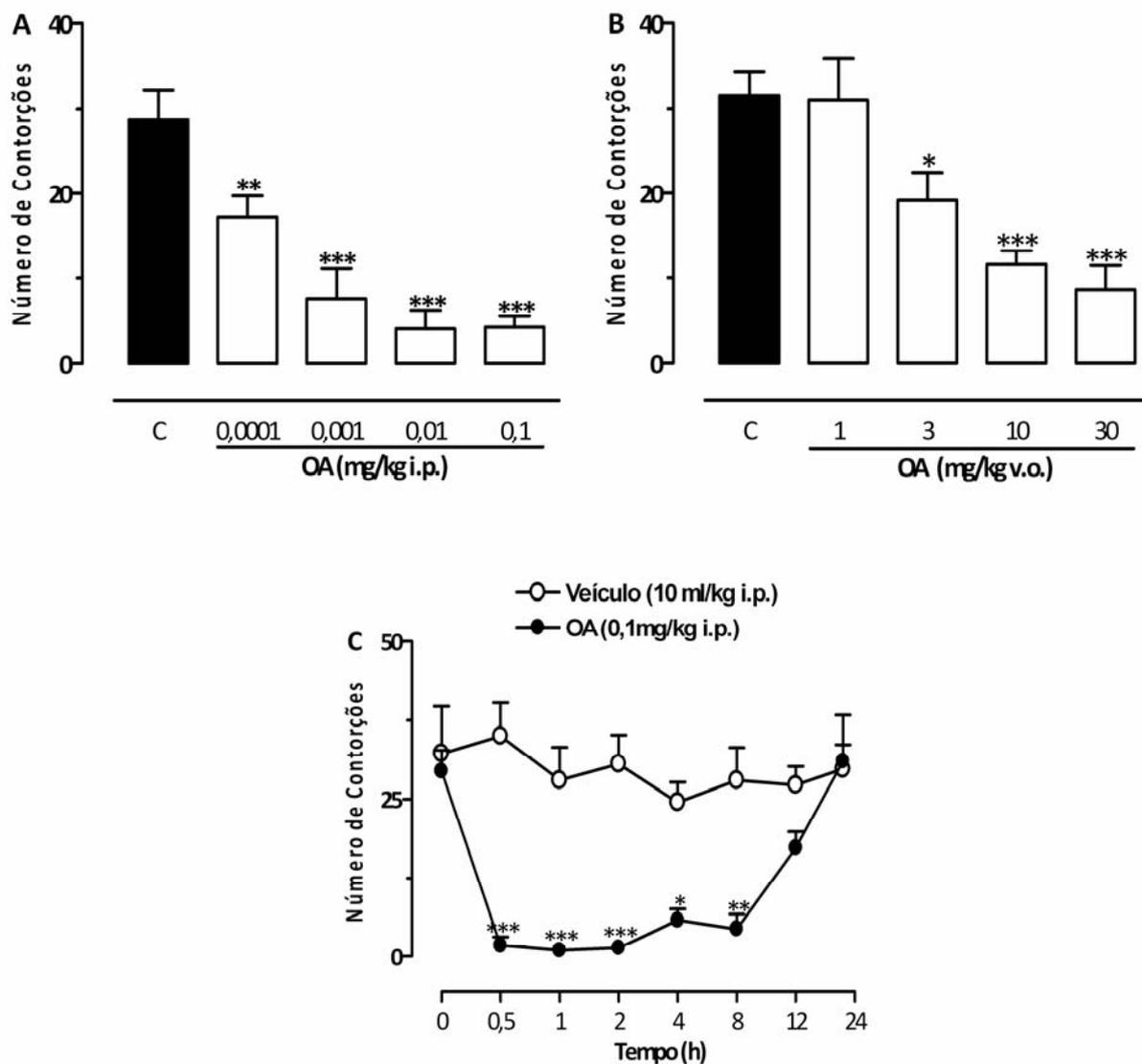


Figura 5: Efeito da administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina na nociceção induzida pelo ácido acético em camundongos. O octanoato de α e β -amirina foi administrado pelas vias intraperitoneal (0,0001 – 0,1 mg/kg, A) ou oral (1 – 30 mg/kg, B). O gráfico (C) mostra o efeito dependente do tempo do OA (0,1 mg/kg i.p. ●) ou veículo (10 ml/kg i.p. ○) na nociceção induzida pelo ácido acético. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (C) ou (○). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls* (gráficos A e B) e ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc *Bonferroni*, (gráfico C).

4.2 Nociceção induzida pela formalina

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que a injeção de formalina (i.pl.) produziu significativa nociceção caracterizada por duas fases distintas. Além disso, o tratamento sistêmico com o octanoato de α e β -amirina (0,1 – 30 mg/kg, i.p.) reduziu de maneira significativa e dependente da dose apenas a nociceção de origem inflamatória (fase II) e não exerceu nenhum efeito significativo sobre a nociceção de origem neurogênica (fase I). O valor de DI_{50} para a fase II foi de 5,36 (3,98–7,23) mg/kg e inibição de $89 \pm 6\%$ na dose de 30 mg/kg.

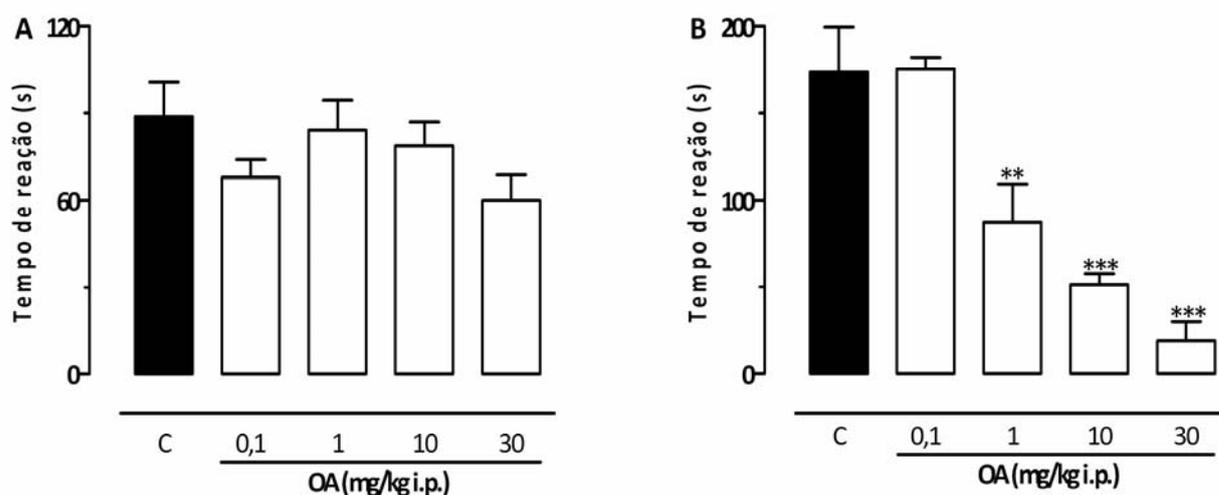


Figura 6: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nociceção induzida pela formalina em camundongos. O octanoato de α e β -amirina foi administrado pela via intraperitoneal (0,1-30 mg/kg) 30 min antes da nociceção induzida pela formalina 2,5% (0,92% formaldeído), sendo o gráfico A representativo da fase I e o gráfico B representativo da fase II. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (C). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.3 Nociceção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na figura 7 mostram que a injeção i.pl. de glutamato produziu significativa nociceção. Além disso, o tratamento sistêmico dos animais com octanoato de α e β -amirina (0,001-1 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa e dependente da dose a nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, com DI_{50} de 0,04 (0,03-0,08) mg/kg e inibição de $65 \pm 5\%$ na dose de 0,1 mg/kg.

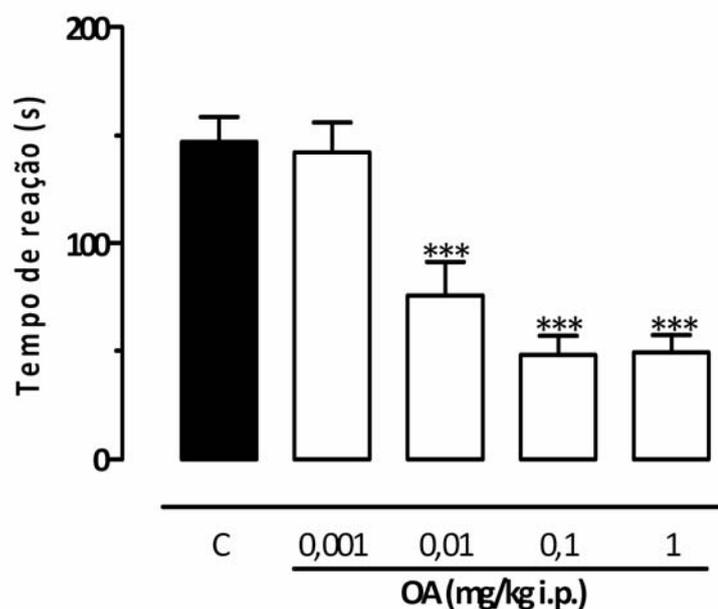


Figura 7: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nociceção induzida pelo glutamato em camundongos. O octanoato de α e β -amirina foi administrado pela via intraperitoneal (0,001-1 mg/kg) 30 min antes da nociceção induzida pelo glutamato (20 μ mol/pata). As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (C). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.4 Nociceção induzida pela capsaicina

A figura 8 mostra que a administração intraplantar de capsaicina (0,1 nmol/pata) induziu pronunciada nociceção em camundongos. O tratamento sistêmico dos animais com octanoato de α e β -amirina (0,001-1 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa e dependente da dose a nociceção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, com DI_{50} de 1,36 (1,12-2,22) mg/kg e inibição máxima de $57 \pm 7\%$ na dose de 1 mg/kg.

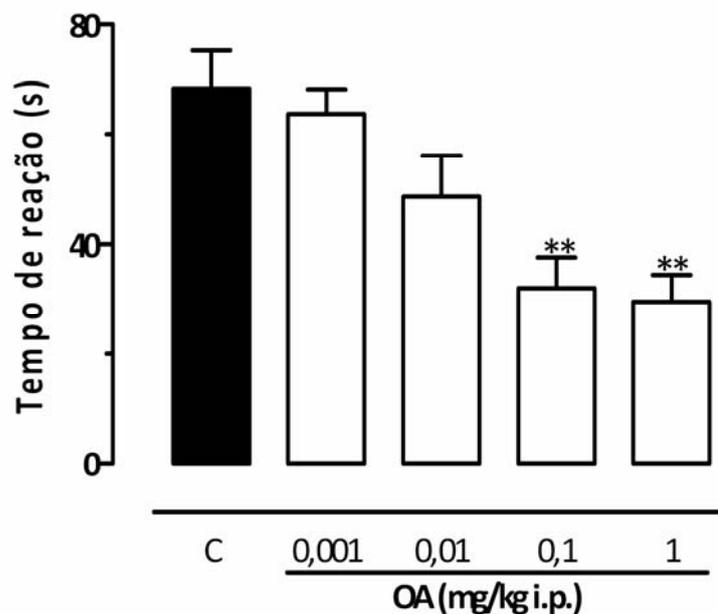


Figura 8: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nociceção induzida pela capsaicina em camundongos. O octanoato de α e β -amirina foi administrado pela via intraperitoneal (0,001-1 mg/kg) 30 min antes da nociceção induzida pela capsaicina (0,1 nmol/pata) em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle (C). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.5 Medida do desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal

O tratamento dos animais com octanoato de α e β -amirina (10-30 mg/kg, i.p.), nas doses que apresentaram efeito antinociceptivo significativo em modelos de nocicepção química mostrados anteriormente, não promoveu mudanças significativas sobre a atividade motora, locomotora e alteração na temperatura corporal, dos animais quando comparado com o grupo controle, avaliados nos mesmos parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do octanoato de α e β -amirina (OA) no desempenho motor, atividade locomotora e temperatura corporal de camundongos.

Treatmento	Rota-rod (s)	Campo aberto	Temperatura (°C)
Controle	94,3 ± 8,9	119,1 ± 8,4	28,1 ± 0,5
OA (10 mg/kg i.p.)	87,6 ± 11,7	113,3 ± 30,1	30,1 ± 0,4
OA (30 mg/kg i.p.)	71,6 ± 11,3	105,8 ± 23,5	29,9 ± 0,6

Os tempos do desempenho motor no (rota-rod), número de cruzamentos (campo aberto) ou a temperatura corporal, foram avaliados 30 min após a administração do OA (10-30 mg/kg, i.p.) ou o veículo do OA (10 ml/kg, i.p.) A análise estatística foi feita utilizando (ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*).

4.6 Nociceção induzida pela administração intratecal de glutamato, substância P e capsaicina.

A administração intratecal de glutamato (175 nmol/sítio), SP (100 pmol/sítio) ou capsaicina (100 pmol/sítio), causaram significativo efeito nociceptivo, caracterizado pelo aumento na resposta do animal lambar e/ou morder as regiões inferiores do corpo. O tratamento sistêmico com o octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) foi capaz de diminuir a nociceção causada pelo glutamato, SP e capsaicina, com reduções de $36 \pm 11\%$, $67 \pm 10\%$ e $75 \pm 5\%$, respectivamente (Figura 9).

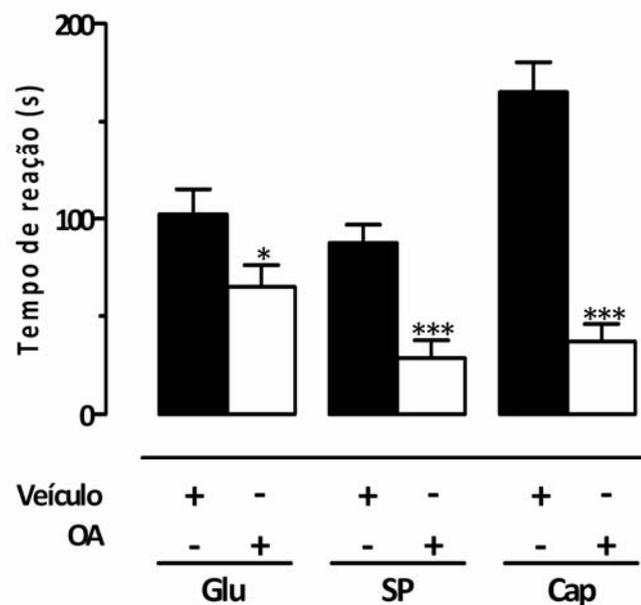


Figura 9: Efeito do octanoato de α e β -amirina na nociceção induzida pela administração intratecal de glutamato, SP e capsaicina em camundongos. O octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg) foram administrados pela via intraperitoneal 30 min antes da nociceção induzida pela administração intratecal de glutamato (Glu, 175 nmol/sítio), SP (0,1 nmol/sítio) e capsaicina (Cap, 100 pmol/sítio). As barras indicam uma media 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam o nível de significância: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo (barras cheias). A análise estatística foi realizada utilizando o teste "t" não pareado.

4.7 Envolvimento do receptor TRPV-1 na periferia

A administração de 10 µl de capsaicina (0,2 nmol/pata) causou uma marcante resposta nociceptiva em camundongos. Contudo, a injeção de 10 µl de capsazepina (1 nmol/pata, antagonista seletivo dos receptores TRPV1) ou octanoato de α e β -amirina (1,8 nmol/pata), 5 min antes da administração de 10 µl de capsaicina reduziu de forma significativa a nocicepção induzida pela capsaicina. A redução foi de $50 \pm 4\%$ para a capsazepina e $77 \pm 5\%$ para o octanoato de α e β -amirina (Tabela 2).

Tabela 2: Nocicepção induzida pela capsaicina na pata de camundongos

Tratamento	(nmol/pata)	Tempo de reação (s)	Inibição
Salina i.pl. + Salina i.pl	0/0	$2,5 \pm 0,6$	-
Salina i.pl. + Capsaicina i.pl	0/0,1	$72,8 \pm 8,1$	-
Capsazepina i.pl. + Capsaicina i.pl.	1/0,1	$36,7 \pm 2,8^{***}$	$50 \pm 4\%$
OA i.pl + Capsacina i.pl.	1,8/0,1	$17,9 \pm 3,3^{***}$	$77 \pm 5\%$

Os valores do tempo de reação (s) foram avaliados por um período de 5 min após a administração da capsaicina ou salina. Cada grupo representa a média de 6-8 animais. Os símbolos *** $p < 0,001$ indicam o nível de significância em relação ao grupo (Salina i.pl. + Capsaicina i.pl). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*

4.8 Estudo do mecanismo de ação

4.8.1 Envolvimento das fibras sensíveis a capsaicina

O tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) produz grande morte neuronal, principalmente de fibras C e A δ . Assim, foi observado que animais que receberam este tratamento reduziram em $55 \pm 6\%$ a resposta nociceptiva induzida pela administração i.p. com ácido acético (Figura 10). Além disso, foi demonstrado que o tratamento neonatal com capsaicina reduziu o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.). A eficiência do tratamento neonatal com capsaicina foi comprovado através da redução de movimentos de coçar o olho induzidos pela administração de capsaicina (0,01%) sobre o olho e avaliados por um minuto. O número médio de movimentos de coçar o olho foi $5,4 \pm 1,8$ e $21,8 \pm 0,7$ segundos em animais tratados com capsaicina ou veículo, respectivamente.

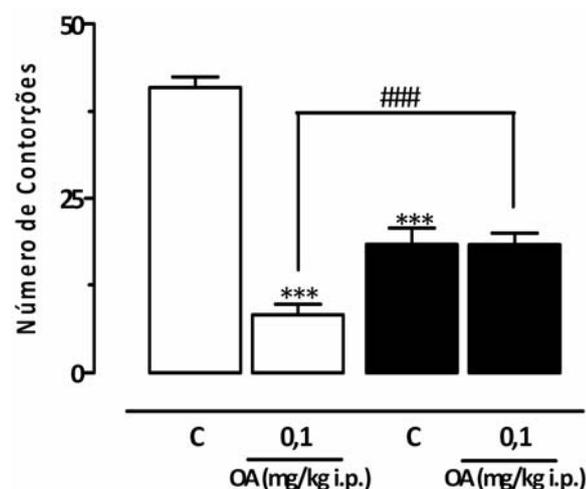


Figura 10: Efeito do octanoato de α e β -amirina em resposta ao tratamento neonatal com capsaicina em camundongos. O octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg) ou veículo (10 mg/kg) foram administrados pela via intraperitoneal 30 min antes da nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). As barras claras correspondem aos animais que receberam veículo neonatal e as barras pretas correspondem aos animais que receberam capsaicina (50 mg/kg) neonatal. Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ***P<0,001 difere significativamente do grupo controle (C, barra clara) e ### P<0,001 difere significativamente entre os grupos que receberam octanoato de α e β -amirina. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.8.2 Envolvimento da proteína G sensível a Toxina Pertussis e dos sistemas, opióide, serotoninérgico, α_2 -adrenergico e colinérgico no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina.

A administração intratecal de toxina Pertussis, um inativador da proteína $G_{i/o}$ (1 $\mu\text{g/sítio}$), resultou em significativa redução do efeito antinociceptivo causado pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo de dor visceral induzida pela administração i.p. de ácido acético. Contudo, o mesmo tratamento com toxina Pertussis não alterou o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) (Tabela 3). Além disso, os resultados apresentados na tabela 3 indicam também que o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.), administrado 20 min antes ou PCPA (100 mg/kg, i.p., administrado por 4 dias consecutivos), reverteram completamente o efeito antinociceptivo da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo do ácido acético, no entanto, não foram capazes de alterar o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.). O tratamento sistêmico com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) 20 min antes reverteu significativamente a antinocicepção causada pela clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), contudo, não modificou o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.) (Tabela 3). Finalmente, o pré-tratamento com mecamilamina (2 mg/kg, i.p.) ou atropina (1 mg/kg, i.p.), 20 min antes, reverteu de forma significativa a antinocicepção causada pela nicotina (1 mg/kg, i.p.) ou policarpina (3 mg/kg, i.p.), respectivamente, mas não alteraram o efeito antinociceptivo causado pelo octanoato de α e β -amirina (0,1 mg/kg, i.p.), no modelo do ácido acético (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação do mecanismo de ação do octanoato de α e β -amirina (OA) utilizando o modelo de nociceção induzida pelo ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Número de contorções
Controle	0	32,8 \pm 5,1
Toxina Pertussis (i.t.)	0,0025	28,0 \pm 6,0 ^{N.S.}
Morfina (i.p.)	2,5	3,0 \pm 1,8***
Toxina Pertissis + Morfina	0,0025/2,5	37,0 \pm 5,0###
OA (i.p.)	0,1	4,2 \pm 1,8***
Toxina Pertussis + OA	0,0025/0,1	2,0 \pm 1,7***
Controle	0	34,4 \pm 2,2
Naloxona (i.p.)	1	30,5 \pm 3,5 ^{N.S.}
Morfina (i.p.)	2,5	2,0 \pm 1,1***
Naloxona + Morfina	1/2,5	20,6 \pm 3,3 ###
OA (i.p.)	0,1	0,8 \pm 0,4***
Naloxona + OA	1/0,1	2,4 \pm 0,9***
Controle	0	26,2 \pm 2,7
PCPA (i.p.)	100	30,8 \pm 1,3 ^{N.S.}
Morfina (i.p.)	2,5	1,8 \pm 0,8***
PCPA + Morfina	100/2,5	8,8 \pm 1,5###
OA (i.p.)	0,1	3,8 \pm 2,3***
PCPA + OA	100/0,1	2,2 \pm 1,0***
Controle	0	26,0 \pm 4,3
Ioimbina (i.p.)	0,15	27,8 \pm 2,9 ^{N.S.}
Clonidina (i.p.)	0,1	6,0 \pm 1,8***
Ioimbina + Clonidina	0,15/0,1	22,0 \pm 3,9###
OA (i.p.)	0,1	2,2 \pm 0,8***
Ioimbina + OA	0,15/0,1	1,4 \pm 0,6***
Controle	0	59,2 \pm 4,4
Mecamilamina (i.p.)	2	55,5 \pm 3,3 ^{N.S.}
Nicotina (i.p.)	1	6,8 \pm 1,0***
Mecamilamina + Nicotina	2/1	55,5 \pm 1,5###
OA (i.p.)	0,1	16,0 \pm 1,0***
Mecamilamina + OA	2/0,1	15,0 \pm 1,2***
Controle	0	60,8 \pm 3,8
Atropina (i.p.)	1	61,6 \pm 5,3 ^{N.S.}
Pilocarpina (i.p.)	3	3,0 \pm 1,0***
Atropina + Pilocarpina	3/1	58,5 \pm 3,4###
OA (i.p.)	0,1	16,4 \pm 0,9***
Atropina + OA	1/0,1	17,7 \pm 1,1***

O número de contorções foi cumulativamente contado por um período de 20 min após a administração i.p. de ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-8 animais. Os símbolos *** $P < 0,001$ indicam o nível de significância em relação ao grupo controle. O símbolo ### $P < 0,001$ indicam o nível de significância em relação aos grupos morfina, clonidina, nicotina ou pilocarpina. N.S., não houve significância em comparação com o grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.8.3 Hiperalgisia térmica e mecânica induzida por PGE₂, BK e PMA

Como observado na figura 11, a administração intraplantar de PGE₂ (10 nmol/pata), BK (3 nmol/pata) ou PMA (0,1 nmol/pata) induziu hiperalgisia térmica (modelo de Hargreaves) e mecânica (modelo do Randall & Selitto) em ratos. De fato, a PGE₂, BK e PMA reduziram em 72 ± 4%, 44 ± 6% e 61 ± 5%, respectivamente, a latência de retirada da pata para o estímulo térmico, bem como, causaram redução da latência em 54 ± 4%, 51 ± 6% e 56 ± 7% para a pressão em gramas suportada, respectivamente, comparado com o grupo controle. O tratamento sistêmico dos animais com octanoato de α e β-amirina nas doses de 0,1 – 1 mg/kg, i.p. não reduziu nem a hiperalgisia térmica nem a hiperalgisia mecânica induzida pela PGE₂ (Figura 11A e D). Contudo, o mesmo tratamento com octanoato de α e β-amirina (0,1 – 1 mg/kg, i.p.) reverteu a hiperalgisia térmica provocada pela BK e PMA, com reversão de 76 ± 7% e 91 ± 4% na dose de 1 mg/kg, respectivamente (Figura 11B e C). Além disso, o tratamento com octanoato de α e β-amirina (0,1 – 1 mg/kg, i.p) reverteu completamente a hiperalgisia mecânica induzida pela administração intraplantar de BK e PMA com reversão de 100% e 91 ± 2% na dose de 1 mg/kg, respectivamente (Figura 11E e F).

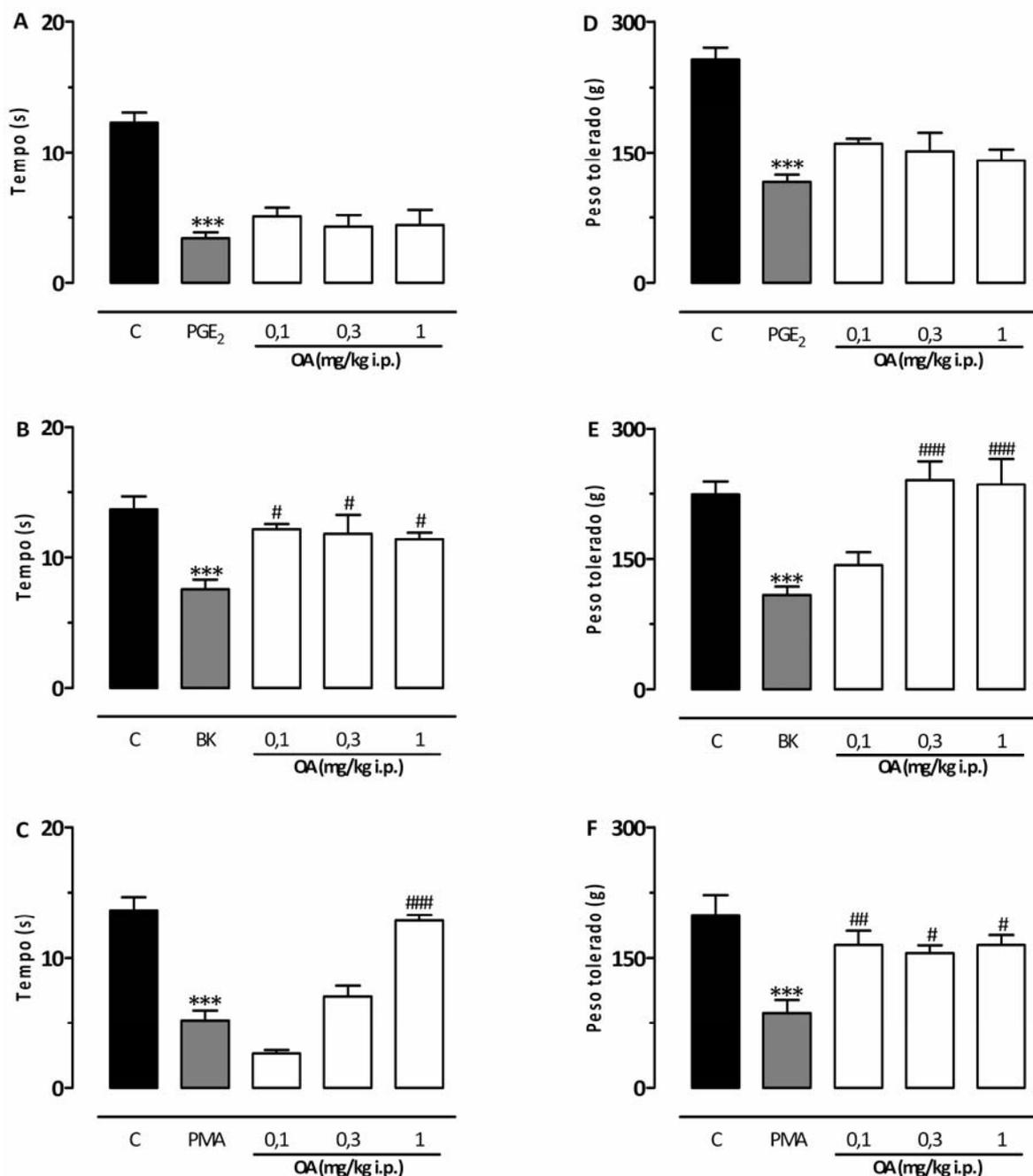


Figura 11: Efeito do octanoato de α e β -amirina frente à indução de hiperalgesia térmica e mecânica em ratos. O octanoato de α e β -amirina (0,1-1 mg/kg, barra branca) ou veículo (10 mg/kg, barra cinza) foram administrados pela via intraperitoneal 30 min antes dos agentes flogísticos e avaliados na hiperalgesia térmica (A, B e C) e mecânica (D, E e F), induzidas pela administração intraplantar de PGE₂ (10 nmol/pata, A e D), BK (3 nmol/pata, B e E) e PMA (0,1 nmol/pata, C e F) em ratos. O grupo controle (C, barra preta) foi tratado com veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min depois recebeu salina intraplantar. Cada grupo representa a media de 6-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ***P<0,001 difere significativamente do grupo controle (C, barra preta) e #P<0,05 ##P<0,01 ###P<0,001 difere significativamente entre os grupos que receberam as substâncias álgicas (barra cinza). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc Newman-Keuls.

4.8.4 Nocicepção induzida pelo PMA e western blot para PKC ϵ

A figura 12A mostra que a administração intraplantar de PMA causou significativo efeito nociceptivo em camundongos. O tratamento sistêmico com o octanoato de α e β -amirina (3-30 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de PMA, com DI_{50} de 19,6 (13,5-28,8) mg/kg e redução máxima de $64 \pm 9\%$ na dose de 30 mg/kg. Além disso, foi observado em ensaios de western blot que o PMA promoveu a ativação da PKC ϵ , demonstrado pela translocação da PKC ϵ do citosol (Figura 9B) para a membrana (Figura 12C). No entanto, o pré tratamento com o octanoato de α e β -amirina (30 mg/kg, i.p.) não alterou a ativação da PKC ϵ em tecidos de pata de animais que receberam PMA i.pl.

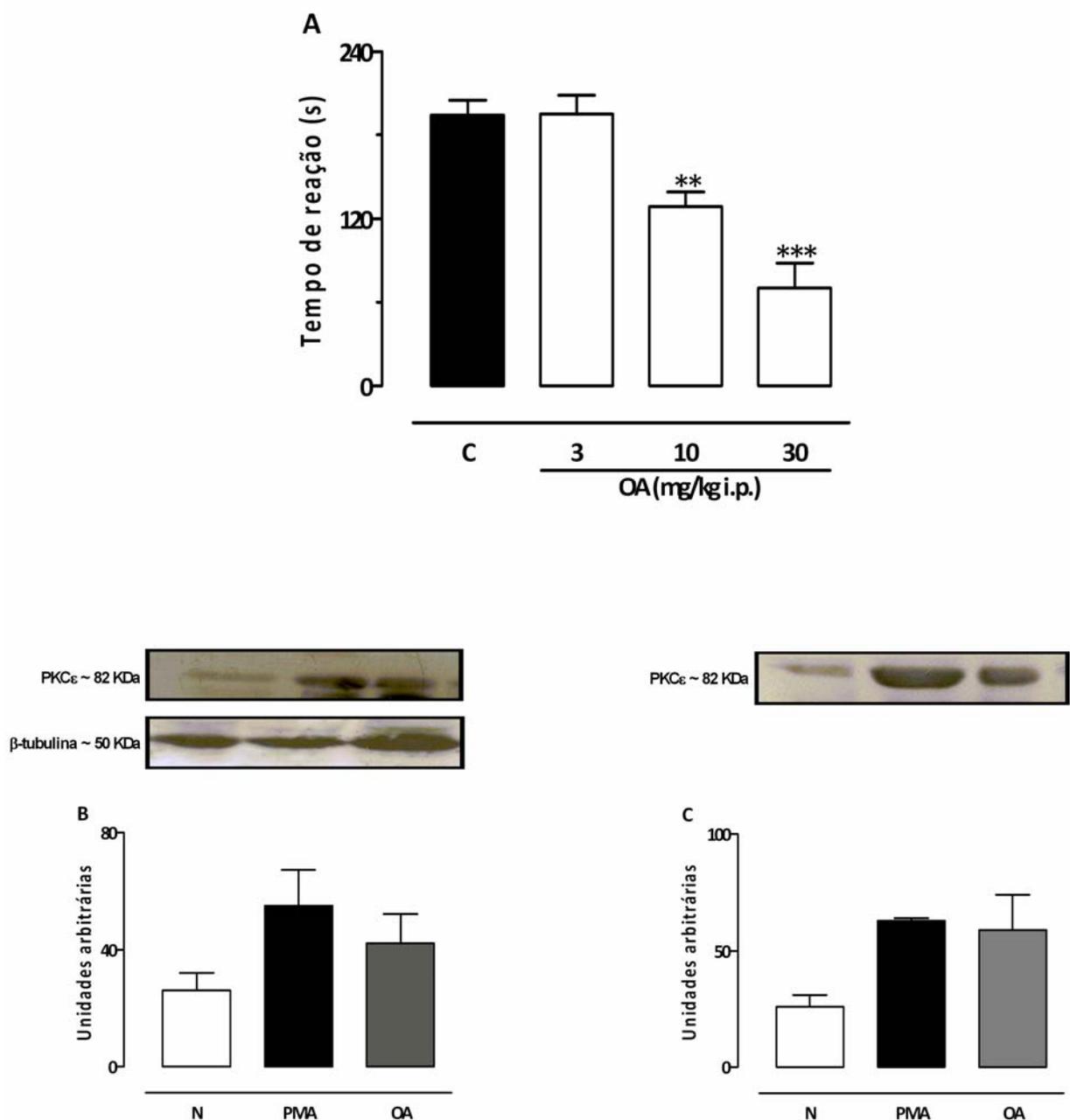


Figura 12: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre a nociceção e a ativação da PKC induzida pelo PMA em camundongos. O octanoato de α e β -amirina foi administrado pela via intraperitoneal (3-30 mg/kg, A) 30 min antes da nociceção induzida pela administração intraplantar de PMA (500 pmol/pata). Os gráficos (B e C) mostram através do ensaio de western blot a translocação da PKC ϵ do citosol (B) para a membrana (C). O octanoato de α e β -amirina (30 mg/kg, barra cinza) ou veículo (10 mg/kg, barra preta) foram administrados pela via intraperitoneal 30 min antes da injeção intraplantar de PMA (500 pmol/pata). A barra branca são animais que não foram manipulados (naive, N). Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C, barra preta). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.9 Avaliação da atividade antiinflamatória

4.9.1 Avaliação da atividade antiedematogênica do octanoato de α e β -amirina no modelo do edema de pata

A figura 13 demonstra que a injeção de Cg (300 μ g/sítio) na pata de camundongos causou significativa formação de edema. Foi observado que a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina (0,1 – 10 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção de Cg foi capaz de reduzir significativamente e de forma dependente da dose o edema. Além disso, o pré-tratamento com Ind (4 mg/kg, i.p.) um antiinflamatório não esteroidal, reduziu quase que totalmente o edema induzido pela carragenina.

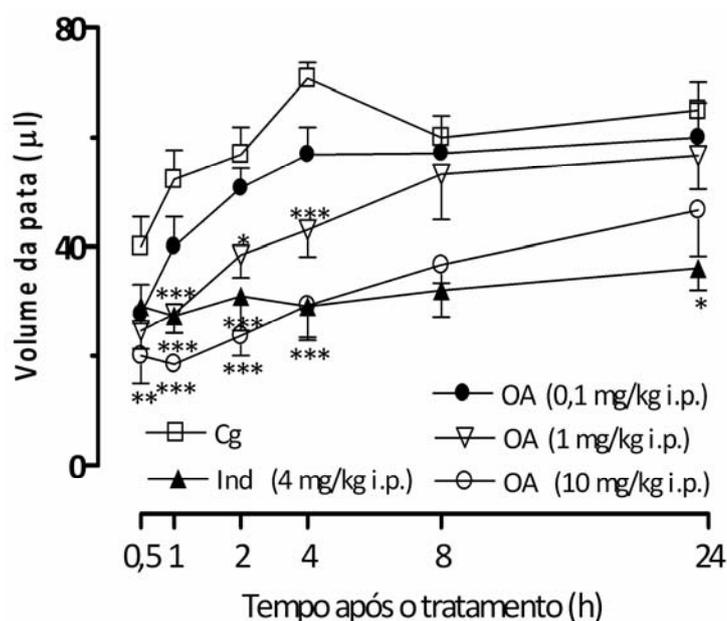


Figura 13: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina em camundongos. Os animais receberam octanoato de α e β -amirina nas doses de (0,1 – 10 mg/kg i.p.), indometacina (Ind, 4 mg/kg i.p.) ou veículo (Cg, grupo controle) e 30 min depois foi administrado Cg na pata direita do animal e solução salina na pata esquerda. O efeito antiedematogênico foi avaliado pela variação do volume da pata em diferentes tempos após a administração de Cg. Cada grupo representa a média de 6-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001 difere significativamente do grupo (Cg). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.9.2 Dosagem de MPO, IL-1 β e TNF- α da pata de camundongos

O infiltrado de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da atividade de enzima mieloperoxidase (MPO). A figura 14A demonstra que 4 horas após a administração de Cg (300 µg/sítio), ocorreu um aumento significativo da quantidade de MPO encontrada na pata, quando comparada com o grupo controle (C). O pré-tratamento com octanoato de α e β -amirina (0,1 – 10 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa e dependente da dose os níveis de MPO, com DI_{50} 0,2 (0,05 – 0,45) mg/kg e redução de 100% na dose de 10 mg/kg. A Ind (4 mg/kg, i.p.) administrada sistemicamente também reduziu em $60 \pm 8\%$ os níveis da MPO. Além disso, as figuras 14 (B e C) mostram que 4 horas após a administração intraplantar de Cg, ocorreu um aumento significativo nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , respectivamente, quando comparada com o grupo controle (C). Tanto a administração sistêmica do OA (10 mg/kg, i.p.) quanto da Ind (4 mg/kg i.p.) reduziram a níveis basais a quantidade de IL-1 β , mas não modificaram os níveis de TNF- α encontrado na pata.

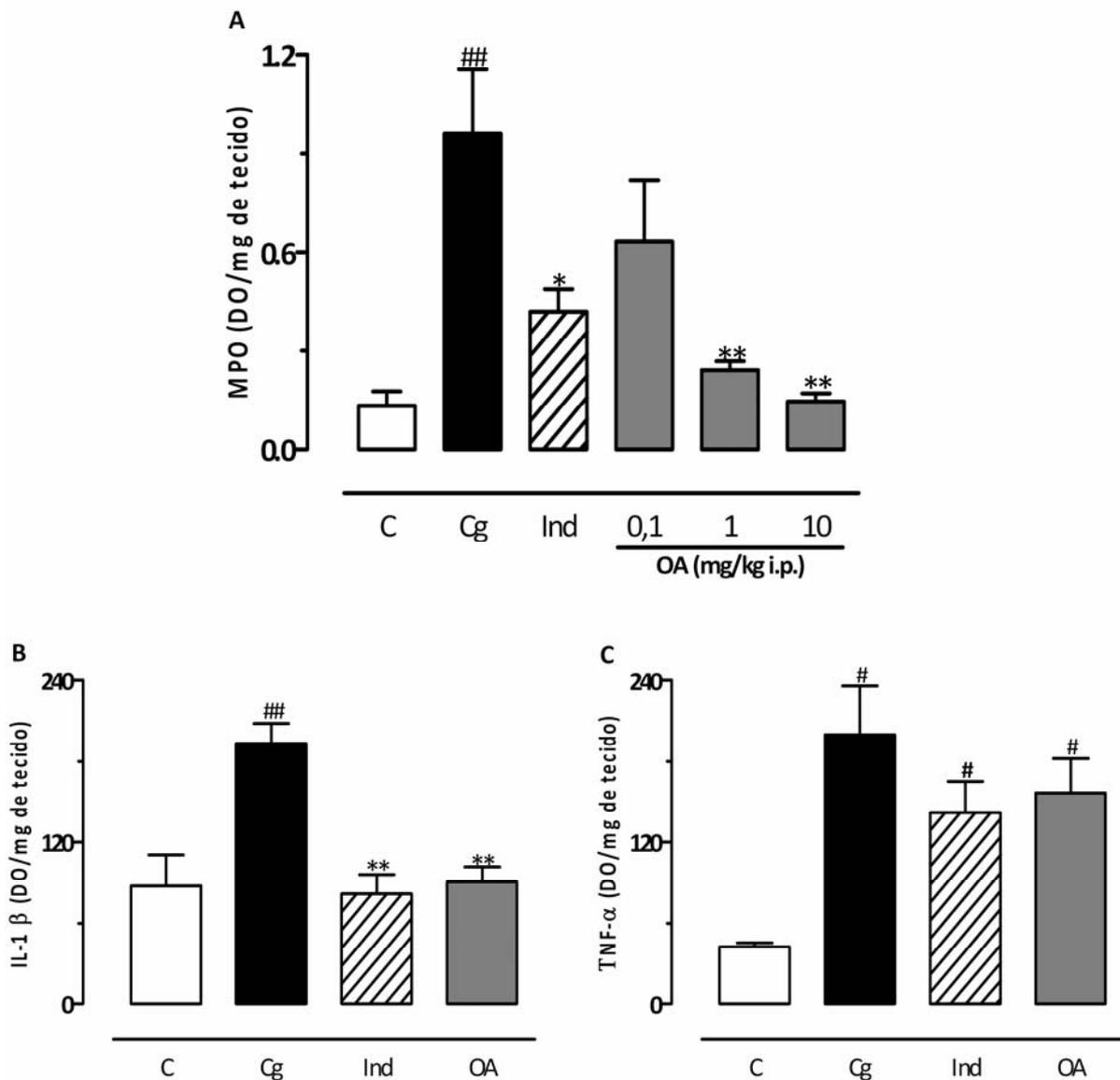


Figura 14: Efeito do octanoato de α e β -amirina sobre os níveis teciduais da MPO, IL-1 β e TNF- α após a administração intraplantar de carragenina em camundongos. Os animais receberam octanoato de α e β -amirina nas doses de (0,1 – 10 mg/kg, i.p. barra cinza), indometacina (Ind, 4 mg/kg, i.p. barra hachurada) ou veículo (10 ml/kg, i.p. barra preta) e 30 min depois foi administrado Cg na pata. Quatro horas depois os seguintes parâmetros foram analisados: MPO (A), IL-1 β (B) e TNF- α (C). A barra branca são animais que receberam veículo (10 ml/kg i.p.) e 30 min depois foi administrado solução salina na pata. Cada grupo representa a media de 4-8 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (Cg, barra preta) e # $P < 0,05$ e ### $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (C, barra branca). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

4.9.3 Avaliação da atividade antiinflamatória do OA no modelo de pleurisia em camundongos

Os resultados apresentados na figura 15 (A-E) mostram que a administração de Cg (1%) injetada na região da pleura causou um significativo aumento na migração total de células, sendo estas constituídas basicamente de polimorfonucleares, pois não houve alteração de células mononucleares quando comparada com o grupo controle (C). A carragenina também provocou um aumento nos níveis de MPO encontrados no pulmão, bem como o extravasamento plasmático na região da pleura, quando comparada com o grupo controle (C). O tratamento sistêmico com octanoato de α e β -amirina (0,1 – 10 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa e dependente da dose a migração total de leucócitos no líquido pleural coletado, com DI_{50} de 4,5 (2,3 – 9,1) mg/kg e redução de $57 \pm 1\%$ na dose de 10 mg/kg. O mesmo tratamento com octanoato de α e β -amirina diminuiu de forma significativa e dependente da dose a migração de células polimorfonucleares para o líquido pleural, com DI_{50} de 4,7 (2,6-8,3) mg/kg e inibição de $72 \pm 5\%$ na dose de 10 mg/kg. Além disso, octanoato de α e β -amirina causou redução também na atividade da MPO presentes no pulmão, com DI_{50} de 2,2 (0,3 – 7,2) mg/kg e redução de $95 \pm 2\%$ na dose de 10 mg/kg. Contudo, o octanoato de α e β -amirina não foi capaz de reduzir o extravasamento plasmático induzida pela Cg, nem a migração de mononucleares. A administração de dex (1 mg/kg, s.c.), 2 horas antes da injeção de Cg na pleura, causou redução na migração leucocitária, extravasamento plasmático, células polimorfonucleares e atividade de MPO, com redução de $63 \pm 8\%$, $33 \pm 7\%$, $71 \pm 1\%$ e $93 \pm 3\%$, respectivamente. Contudo, o pré-tratamento com dexametasona não foi capaz de alterar a quantidade de células mononucleares encontradas na pleura.

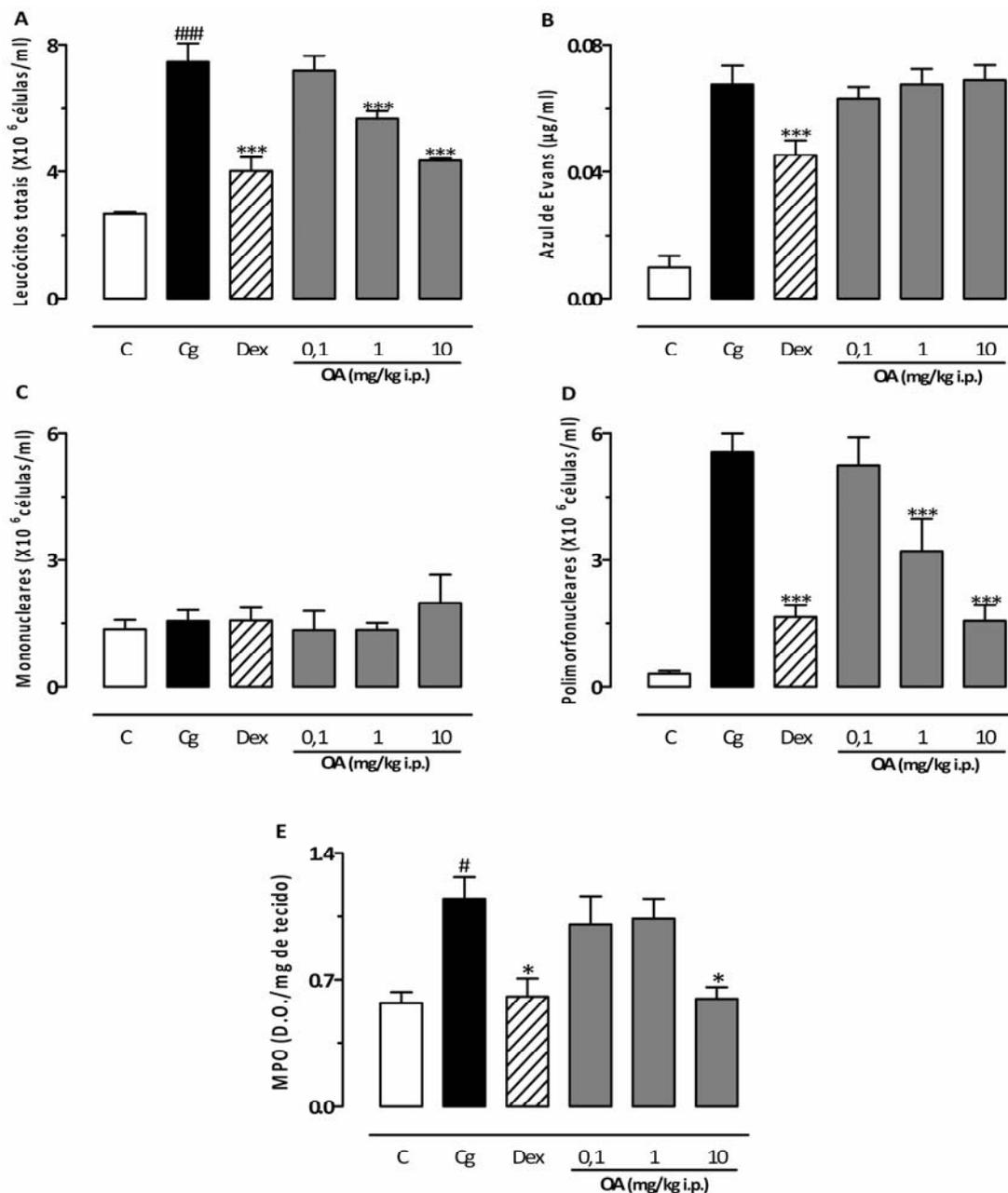


Figura 15: Efeito do octanoato de α e β -amirina ou dexametasona na pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Os animais receberam octanoato de α e β -amirina nas doses de (0,1 – 10 mg/kg, i.p. barra cinza), dexametasona (Dex, 1 mg/kg, i.p. barra hachurada) ou veículo (10 ml/kg, i.p. barra preta) e 0,5, 2 e 0,5 horas depois, respectivamente, foi administrado Cg na pleura. Quatro horas depois os seguintes parâmetros foram analisados: totais (A), extravasamento plasmático (B), células mononucleares (C), células polimorfonucleares (D) e atividade da MPO no pulmão (E). A barra branca são animais que receberam veículo (10 ml/kg i.p.) e 30 min depois foi administrado solução salina na pleura. Cada grupo representa a media de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (Cg, barra preta) e # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C, barra branca). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo post hoc *Newman-Keuls*.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Atualmente, existe uma considerável quantidade de trabalhos demonstrando que os triterpenos α e β -amirina, extraídos da resina e de folhas das plantas pertencentes às espécies *Protium heptaphyllum* e *Protium kleinii*, quando administrados sistemicamente, apresentam um pronunciado efeito antinociceptivo em diferentes modelos de nocicepção química, térmica e mecânica, além de possuírem significativa atividade antiinflamatória (Recio *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2005; Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005; Lima-Junior *et al.*, 2006; Aragao *et al.*, 2007; Lima-Junior *et al.*, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a administração sistêmica, tanto pela via oral quanto pela via intraperitoneal, do octanoato de α e β -amirina, um derivado semi-sintético dos triterpenos α e β -amirina, reduziu significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, bem como também foi efetivo em reduzir a resposta nociceptiva evocada pela administração intraplantar de formalina, em camundongos (Soldi *et al.*, 2007). Dessa forma, estes dados confirmam que o octanoato de α e β -amirina, quando administrado pela via intraperitoneal ou pela via oral produz uma resposta antinociceptiva rápida e de forma dependente da dose. Além disso, a resposta antinociceptiva observada no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi mantida por um longo período após a administração do octanoato de α e β -amirina.

O presente estudo demonstrou primeiramente que, (1) a administração do octanoato de α e β -amirina pela via intraperitoneal produziu efeito antinociceptivo marcante e dependente da dose nos modelos de nocicepção induzida pela capsaicina e glutamato administrados na pata de camundongos; (2) a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina reduziu a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato, SP e capsaicina; (3) a administração intraplantar do octanoato de α e β -amirina ou de capsazepina reduziu a nocicepção pela administração intraplantar de capsaicina; (4) o mecanismo pelo qual o octanoato de α e β -amirina causa o efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético parece não envolver a ação da proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina pertussis, nem dos sistemas, opióide, serotoninérgico, α_2 -adrenérgico e colinérgico; (5) o tratamento neonatal com capsaicina aboliu

totalmente o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina; (6) a administração intraperitoneal do octanoato de α e β -amirina reduziu de maneira dependente da dose a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela BK e PMA em ratos; (7) a administração do octanoato de α e β -amirina pela via intraperitoneal reduziu a nocicepção provocada pela injeção intraplantar de PMA, mas não alterou a ativação da PKC; (8) a administração do octanoato de α e β -amirina reduziu de maneira dependente da dose o edema de pata induzido pela carragenina e os níveis de MPO e IL-1 β na pata (9), além disso, o octanoato de α e β -amirina reduziu a migração de células totais e polimorfonucleares na cavidade pleural e no pulmão, provocado pela carragenina administrada na pleura de camundongos.

No presente trabalho foi possível obter importantes avanços acerca dos mecanismos de ação responsáveis pela atividade antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina em camundongos. Além disso, foi demonstrado que a administração do octanoato de α e β -amirina pelas vias oral ou intraperitoneal não resultam em qualquer efeito inespecífico, como sedação ou prejuízo motor, nas doses das quais ele produz pronunciado efeito antinociceptivo, anti-hiperalgésico ou antiinflamatório. Tendo em vista que o octanoato de α e β -amirina não alterou a resposta motora, como demonstrado no aparelho de rota-rod, também não foi observado prejuízo na locomoção, conforme os resultados obtidos no modelo de campo aberto. Além disso, o tratamento com octanoato de α e β -amirina também não alterou a temperatura corporal medida na cauda do animal.

Inicialmente, este trabalho foi conduzido utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com a intenção de avaliar a atividade antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina, bem como o tempo inicial de sua ação e a duração de seu efeito. O modelo do ácido acético vem sendo utilizado há muitos anos e se tornou uma valiosa ferramenta para a triagem de novos agentes com atividade analgésica e/ou antiinflamatória, tendo em vista que este modelo é sensível a fármacos com estas propriedades (Tjølsen *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1999; Le Bars *et al.*, 2001). A administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de muitos mediadores presentes no processo inflamatório, como as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandinas, BK entre outros, sendo considerado, portanto, um típico modelo de nocicepção inflamatória visceral (Ribeiro *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001). A nocicepção causada pelo ácido acético, além de ser influenciada pelas muitas substâncias pró-inflamatórias liberadas, pode ser mediada

em parte pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam diretamente canais de cátions não seletivos, como ASICs e TRPV1 localizados em neurônios aferentes primários, promovendo assim o início da dor visceral (Ikeda *et al.*, 2001; Julius *et al.*, 2001; Coutaux *et al.*, 2005). De fato, a acidificação do tecido pode ocorrer em uma variedade de patologias, e os prótons podem estar envolvidos na geração da dor inflamatória (Reeh *et al.*, 2001; Voilley *et al.*, 2001). O octanoato de α e β -amirina quando administrado pela via oral ou via intraperitoneal, reduziu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção provocada pelo ácido acético em camundongos. A eficácia para ambas as vias foram semelhantes, contudo a potência foi significativamente maior quando a administração foi pela via intraperitoneal, assim, optou-se por esta via para prosseguir com os demais experimentos. Foi observado ainda que o octanoato de α e β -amirina, quando administrado pela via intraperitoneal, produziu seu efeito antinociceptivo máximo após 30 min de sua administração, efeito este que decresceu de maneira gradual, permanecendo significativo por até 8 h.

Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, os quais demonstram que a administração dos triterpenos α e β -amirina tanto pela via oral quanto intraperitoneal foram efetivas em diminuir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). Embora, a eficácia do octanoato de α e β -amirina seja a mesma de seu precursor no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, a potência do octanoato de α e β -amirina foi significativamente maior ao dos triterpenos α e β -amirina, o que nos sugere que a mudança estrutural provocada na molécula possa ter alterado a farmacocinética e/ou farmacodinâmica. Dessa forma, com a intenção de ampliar o conhecimento a respeito do efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, nós utilizamos o modelo de indução de nocicepção pela formalina.

Assim, demonstramos que o octanoato de α e β -amirina, quando administrado pela via intraperitoneal foi efetivo em reduzir apenas a fase II (inflamatória) da nocicepção induzida pela administração intraplantar de formalina, contudo, não foi eficaz em reduzir a nocicepção na fase I (neurogênica) deste modelo. A nocicepção neurogênica caracteriza-se pela ativação direta dos nociceptores presentes em axônios não-mielinizados como fibras C e pouco mielinizadas, como as fibras A δ , acarretando na liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP em terminais periféricos e centrais (Mccall *et al.*, 1996; Puig *et al.*, 1996). A fase quiescente é

caracterizada pela ativação da via inibitória descendente, reduzindo assim o comportamento nociceptivo (Sweitzer, Wong *et al.*, 2004). Já a nocicepção induzida na fase II (inflamatória), é mediada pela combinação de mecanismos de sensibilização, tanto na periferia quanto a nível central (Hunskaar *et al.*, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992). Tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores provoca a liberação de várias substâncias álgicas e pró-inflamatórias, as quais podem estar diretamente relacionadas às fases características deste modelo. Dentre as substâncias liberadas, podemos destacar o glutamato, prostaglandinas, óxido nítrico, taquicinas, prótons, BK, dentre outros (Tjolsen *et al.*, 1992; Malmberg *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1997a).

A atividade do octanoato de α e β -amirina avaliado no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, parece diferir da atividade de seu precursor α e β -amirina, pois, foi demonstrado que a α e β -amirina reduziu ambas as fases do modelo de nocicepção induzido pela formalina, e esses efeitos parecem envolver a inibição da PKA e da PKC (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005).

Trabalhos têm mostrado o papel importante da PKC na estimulação nociceptiva na segunda fase do modelo de formalina, evidenciado pelo fato de inibidores não seletivos da PKC atenuarem apenas a fase inflamatória do modelo (Yashpal *et al.*, 1995). Além disso, tem se observado um aumento na translocação e ativação da PKC em neurônios do corno dorsal após a administração periférica da formalina (Yashpal *et al.*, 1995) além de aumento na imunoreatividade da PKC na lamina II depois da administração deste agente álgico (Malmberg, Chen *et al.*, 1997). De fato, camundongos deficientes de PKC têm diminuição no comportamento nociceptivo induzido pela formalina (Malmberg, Chen *et al.*, 1997). Duas isoformas da PKC tem se destacado na estimulação nociceptiva provocada pela administração intraplantar de formalina, a PKC ϵ e a PKC γ (Sweitzer, Wong *et al.*, 2004). O efeito nociceptivo de ambas pode estar intimamente relacionado à ativação dos receptores do tipo TRPV1 (Hwang *et al.*, 2000) e substâncias que modulam o receptor TRPV1 reduzem a nocicepção induzida pela formalina (Santos *et al.*, 1997b) mostrando que ambos, PKC e TRPV1 são importantes neste modelo de nocicepção.

Dessa forma, foi investigado se a antinocicepção produzida pelo octanoato de α e β -amirina envolve a modulação dos receptores TRPV1. Os receptores TRPV1 são encontrados tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico, e são envolvidos na transmissão, integração e modulação da sensação

dolorosa (Cui *et al.*, 2006; Brauchi *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que a utilização de antagonistas desse receptor provoca antinocicepção em vários modelos experimentais, tanto em camundongos, quanto em ratos (Santos *et al.*, 1997b; Jhaveri *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2008). Os receptores TRPV1 são expressos principalmente em fibras nociceptivas do tipo C e A δ , sendo ativados por uma variedade de compostos, tanto endógenos como prótons e endocanabinóides, quanto exógenos como capsaicina e eugenol (Belmonte *et al.*, 2008).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é uma substância ativa obtida da pimenta vermelha, *Capsicum annuum* L. que, há algum tempo vem sendo utilizada como uma ferramenta farmacológica útil para o estudo de subtipos de fibras sensoriais primárias, incluindo os nociceptores polimodais e termoreceptores (Jancso, 1978; Holzer, 1991). Foi demonstrado que a nocicepção induzida pela capsaicina é mediada principalmente pela ativação do receptor TRPV1 (Szallasi *et al.*, 1993; Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998), promovendo a entrada de cátions e causando estimulação nociceptiva direta das fibras aferentes primárias. Além disso, a ativação do TRPV1 provoca a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e mediadores inflamatórios, os quais contribuem para a sensibilização e ativação das fibras aferentes nociceptivas (Szallasi *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1997b; Sakurada *et al.*, 2003).

No presente trabalho foi demonstrado que o tratamento sistêmico com o octanoato de α e β -amirina reduziu a nocicepção induzida pela administração intraplantar e intratecal de capsaicina em camundongos. Além disso, o octanoato de α e β -amirina, quando co-administrado com a capsaicina, foi mais efetivo em reduzir a nocicepção em comparação com o efeito da capsazepina (antagonista seletivo dos receptores TRPV1). De fato, foi demonstrado que a nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina em camundongos e a dor orofacial induzida pela capsaicina em ratos foram reduzidas pelo tratamento prévio com α e β -amirina (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005; Holanda Pinto *et al.*, 2008). Assim, observou-se que o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina frente ao estímulo algico provocado pela capsaicina é semelhante ao efeito dos triterpenos α e β -amirina. Contudo, não foi encontrado efeito aditivo ou antagonístico quando a α e β -amirina foi co-administrada com o ruthenium red (antagonista não seletivo dos receptores TRPV1) na nocicepção induzida pela capsaicina, indicando que pode não haver uma

interação direta da α e β -amirina como o receptor TRPV1 (Oliveira *et al.*, 2005). De fato, o mecanismo de ação antinociceptivo dos triterpenos α e β -amirina parece não ser por inibição direta do receptor TRPV1, comprovado através de estudos de “binding” com [3 H]-Resiniferotoxina em frações de medula espinhal (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). Sendo assim, esses experimentos não permitem afirmar se o octanoato de α e β -amirina estaria modulando diretamente os receptores TRPV1.

Recentemente, Medvedeva e colaboradores (2008) mostraram que a capsaicina, quando ligada a receptores TRPV1, provoca a liberação de peptídeos neuroativos e neurotransmissores, incluindo o glutamato e a SP em terminais periféricos e centrais de neurônios sensoriais primários e essa liberação tem envolvimento de proteínas quinases como a PKC. De fato, a PKC tem um papel importante na liberação desses neurotransmissores na medula espinhal, tendo em vista que inibidores dessa proteína reduziram a liberação de glutamato e CGRP provocados pela estimulação com a capsaicina (Sweitzer, Allen *et al.*, 2004).

Dessa forma foi avaliado o papel do glutamato frente à resposta antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina. O glutamato é um dos neurotransmissores mais importantes envolvidos na estimulação nociceptiva, tanto na periferia quanto no SNC (Millan, 1999; Fundytus, 2001). Além disso, tem sido relatado que o glutamato estimula a liberação de aminoácidos excitatórios, prostaglandinas, óxido nítrico, cininas (Beirith *et al.*, 2002; Sakurada *et al.*, 2003), SP, BDNF e prótons no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 1999). Os prótons poderiam interagir com receptores TRPV1 e/ou ASICs e assim propagar a transmissão do sinal nociceptivo (Julius *et al.*, 2001).

Segundo Beirith e colaboradores (2002) a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver locais de ação espinhal e supra-espinhal e esses efeitos podem ser mediados por diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos. De fato, a injeção de glutamato na pata de animais provoca pronunciada nocicepção. Nossos resultados demonstram que a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina produziu uma inibição significativa da resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar e intratecal de glutamato em camundongos. Estes resultados vão ao encontro com dados apresetados pelos triterpenos α e β -amirina, que foram efetivos em reduzir a nocicepção provocada pelo glutamato, e esse mecanismo parece proceder pela inibição de quinases (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). De fato, a PKC γ pode potencializar as correntes excitatórias induzidas pelo receptor de

glutamato (NMDA) na medula espinhal por reduzir o limiar de voltagem necessário para que o Mg^{2+} desbloqueie o poro (Chen *et al.*, 1992), sendo assim, substâncias que modulam a PKC podem reduzir a nocicepção provocada pelo glutamato. Além disso, foi demonstrado através de estudos de “binding” que os triterpenos α e β -amirina não alteraram a ligação do [3H]-glutamato em preparações de córtex cerebral de ratos (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005), comprovando que não ocorre interação direta com os receptores glutamatérgicos.

Como descrito anteriormente, tanto o glutamato quanto a capsaicina quando administrados periféricamente provocam a liberação do próprio glutamato, SP e prótons em sinapses no corno dorsal (Millan, 1999). Além disso, a administração intratecal de glutamato e da SP causam pronunciada resposta nociceptiva em camundongos (Scheidt *et al.*, 2002), para revisão ver (Bleakman *et al.*, 2006). Sendo assim, nós demonstramos que a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de SP. Sabe-se que os efeitos nociceptivos provocados pela SP pode ser por ligação direta em receptores de neurocininas 1 e consequente ativação da PKC (Coderre *et al.*, 1994; Monastyrskaya *et al.*, 2005). Além disso, foi mostrado que a α e β -amirina reduz o efeito nociceptivo provocado pela SP e esse efeito parece ocorrer por inibição da PKC (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). De fato a administração de um antagonista seletivo da PKC bloqueou completamente a hiperalgesia térmica induzida pela SP em ratos (Wajima *et al.*, 2000). Através destes dados, pode-se sugerir que o octanoato de α e β -amirina poderia estar modulando a atividade da PKC, possuindo efeitos semelhantes ao seu precursor α e β -amirina.

Com a intenção de investigar outros mecanismos acerca do efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, nós utilizamos o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. De fato, um melhor entendimento acerca do mecanismo de ação do octanoato de α e β -amirina poderia aumentar o interesse deste composto como um potencial agente terapêutico.

Estudos têm demonstrado que uma das vias mais importantes para a transmissão nociceptiva são as que envolvem os neurônios periféricos de pequeno diâmetro, compreendendo as fibras do tipo C e $A\delta$, sinalizando assim, informações nociceptivas periféricas para o corno dorsal da medula espinhal (Kumazawa *et al.*, 1996). Dessa forma, no presente estudo, nós ampliamos resultados prévios (Soldi *et al.*, 2007), por demonstrar que o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina

parece envolver as fibras nociceptivas do tipo C ou A δ . Já foi mostrado que o tratamento neonatal com capsaicina, tanto em ratos quanto em camundongos, causa degeneração de fibras sensoriais, principalmente as do tipo C e algumas A δ que expressam os receptores TRPV1 (Sugimoto *et al.*, 1998; Szoke *et al.*, 2002). Esse fenômeno de neurotoxicidade seletiva, causado pela capsaicina em neurônios sensoriais, resulta em pronunciada depleção de neuropeptídeos, como a substância P e o CGRP, que estão implicados no processo de nocicepção e inflamação neurogênica (Szallasi *et al.*, 1999). Dessa forma, é um modelo utilizado para determinar o envolvimento das fibras nociceptivas C e A δ , bem como de neuropeptídeos na ação de novos agentes (Jancso, 1978).

Nossos resultados reforçam essas observações por demonstrar que o tratamento neonatal com capsaicina efetivamente reduziu as contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético, confirmando que a capsaicina, quando administrada no segundo dia de vida de camundongos, causa degeneração de fibras nociceptivas (Jancso, 1978). De forma interessante, o tratamento neonatal com capsaicina bloqueou a antinocicepção promovida pelo octanoato de α e β -amirina, reforçando a importância das fibras nociceptivas que expressam o receptor TRPV1 no efeito antinociceptivo do composto testado.

Mesmo obtendo grandes evidências acerca da ação do octanoato de α e β -amirina, outros mecanismos foram observados utilizando o modelo de administração intraperitoneal de ácido acético. Inicialmente foi promovida a inativação da proteína G_{i/o} pela administração intratecal de toxina pertussis, a qual causa ribosilação da sua subunidade catalítica promovendo a inativação dessa proteína G (Debock *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2003; Savinainen *et al.*, 2004). Este modelo tem sido utilizado para definir o papel desta proteína G no efeito antinociceptivo de várias substâncias (Santos *et al.*, 1999; Meotti *et al.*, 2007). A proteína G_{i/o} quando ativa, provoca o bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem e a ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal (Pertwee, 1999; Schultz *et al.*, 2001). Além disso, muitos dos mecanismos endógenos inibitórios atuam por ativação dessa proteína, como alguns subtipos de receptores opióides, serotoninérgicos e adrenérgicos (Melzack, 1999). No entanto, a participação da proteína G_{i/o} na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina não foi confirmada, pelo fato que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis, em dose capaz de inibir a proteína G_{i/o} e reverter parcialmente o efeito antinociceptivo

da morfina, não foi capaz de alterar o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina no modelo do ácido acético em camundongos. Esses resultados reforçam que o efeito do octanoato de α e β -amirina parece não estar relacionado com mecanismos de ativação da proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina pertussis.

Entre os mecanismos endógenos de controle da dor mais estudados está o sistema opióide. Acredita-se que os efeitos analgésicos provocados tanto por opióides exógenos como a morfina quanto por endógenos como as endorfinas, estejam relacionados primariamente por uma ação no SNC (Pasternak, 1988). No entanto, o mecanismo que resulta na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina parece não estar relacionada com a ação do sistema opióide. O efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, ao contrário da morfina, não foi revertido pela administração prévia do antagonista opióide não-seletivo, naloxona. De fato, no modelo de nocicepção pela formalina, foi demonstrado que o efeito antinociceptivo dos triterpenos α e β -amirina parece não envolver o sistema opióide (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). No entanto, no modelo de nocicepção induzido pela capsaicina, o efeito antinociceptivo dos triterpenos α e β -amirina foi revertido após a administração de naloxona (Oliveira *et al.*, 2005), mostrando que é possível que exista modulação opióide no efeito antinociceptivo dos triterpenos α e β -amirina. Embora os dados da literatura sejam controversos, nas nossas condições experimentais, é provável que o sistema opióide não esteja envolvido na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina.

Adicionalmente, estudos pré-clínicos e clínicos indicam que fármacos antidepressivos que interagem com sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos são capazes de produzir analgesia em humanos e animais (Llorca *et al.*, 1993). De fato, a administração de agonistas serotoninérgicos na medula espinhal de camundongos causa antinocicepção no modelo de retirada da cauda pela estimulação térmica, sendo proposto que neurônios serotoninérgicos ativam interneurônios gabaérgicos, que hiperpolarizam neurônios de segunda ordem, causando redução da transmissão nociceptiva (Alhaidar *et al.*, 1991; Buerkle *et al.*, 1998). Além disso, foi demonstrado que o tratamento agudo com os triterpenos α e β -amirina apresentaram atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongos (Aragao *et al.*, 2006). Dessa forma, foi avaliado o papel da serotonina, bem como, dos receptores α_2 -adrenérgicos, no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina. Para isto, camundongos receberam tratamento com PCPA, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, fundamental

para a síntese de serotonina, em dose capaz de diminuir os níveis cerebrais de serotonina e reverter a antinocicepção causada pela morfina (Pini *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1999; Mendes *et al.*, 2000), o que reforça a importância da serotonina na ação dos opióides. O mesmo tratamento com PCPA falhou em interferir na ação antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina quando avaliado no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Finalmente, os receptores α_2 -adrenérgicos parecem não estar relacionados com o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina no modelo do ácido acético, uma vez que o pré-tratamento dos animais com ioimbina, um antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, não interferiu com o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, na dose em que reverteu o efeito antinociceptivo da clonidina. Estes resultados vão ao encontro dos dados da literatura que mostram que o pré-tratamento dos animais com PCPA ou ioimbina não alteram o efeito antinociceptivo dos triterpenos α e β -amirina (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). De fato, parece que o sistema serotoninérgico e α_2 -adrenérgico não estão envolvidos no efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina.

Algumas das vias de controle da nocicepção como a serotoninérgica e adrenérgica são em parte moduladas pelo sistema colinérgico, e que a administração de agonistas colinérgicos aumenta a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA e glicina (Jones *et al.*, 2007), demonstrando que o sistema colinérgico tem importância fundamental no controle endógeno da dor. De fato, a administração de agonistas nicotínicos (nicotina) e muscarínicos (pilocarpina) causaram efeitos antinociceptivos no modelo do ácido acético. No entanto, o sistema colinérgico parece não estar envolvido com a ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina, uma vez que a mecamilamina (antagonista seletivo dos receptores nicotínicos) e a atropina (antagonista seletivo dos receptores muscarínicos) não alteraram o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, nas doses que reverteram o efeito antinociceptivo dos agonistas específicos.

De acordo com estudos prévios acerca do efeito antinociceptivo da α e β -amirina (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005), a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina inibiu de forma dependente da dose as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Porém, como observado com a α e β -amirina, o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina parece ocorrer independente da ativação de mecanismos de analgesia endógenos, como os opioidérgicos,

serotoninérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos. Como observado anteriormente, a administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de muitos mediadores pró-inflamatórios, como citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandinas, BK, responsáveis tanto pelo processo de inflamação tecidual quanto pela sensibilização de nociceptores, acarretando na percepção significativamente maior da sensação dolorosa, sendo este fenômeno denominado de hiperalgesia (Millan, 1999; Julius *et al.*, 2001).

De fato, a hiperalgesia é um sintoma associado a condições de dores patológicas, onde ocorre sensibilização de fibras aferentes tanto na periferia, quanto na medula espinhal (Millan, 1999). Esta sensibilização é resultado da ativação de diferentes proteínas quinases, resultando na fosforilação de receptores de membrana e canais iônicos (Ji *et al.*, 2001). Além disso, já foi observado que a administração de PGE₂, BK e PMA na pata de ratos, causa hiperalgesia, tanto em modelos térmicos quanto em mecânicos de avaliação (Lucena *et al.*, 2007). De fato, vários mediadores inflamatórios produzem hiperalgesia por sensibilização de fibras nociceptivas pela ação da PKC, PKA e quinases ativadas por mitógenos (Scholz *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem que a hiperalgesia induzida pela PGE₂ poderia ser mediada pela modulação da corrente de canais iônicos e ativação direta da PKA (Portanova *et al.*, 1996; Malmberg, Brandon *et al.*, 1997; Malmberg, Chen *et al.*, 1997; Khasar, Mccarter *et al.*, 1999). Enquanto que a hiperalgesia mediada pela BK e pelo PMA parecem estar associadas à sensibilização periférica pela ativação da PKC e dos receptores TRPV1, modulando a liberação de diversos outros mediadores pró-inflamatórios (Szallasi *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 2005). De fato, tem sido mostrado que a BK leva a translocação do citosol para a membrana celular e consequente ativação das PKCs (α , ϵ , δ , γ) (Cesare *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Chuang *et al.*, 2001; Sagawa *et al.*, 2003), acarretando em eventos de ativação e sensibilização dos neurônios nociceptivos (Premkumar *et al.*, 2000; Vellani *et al.*, 2001).

De forma interessante, a administração intraperitoneal do octanoato de α e β -amirina reduziu significativamente tanto a hiperalgesia térmica, quanto a hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraplantar de BK e PMA em ratos. Ao contrário, a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina não alterou a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela PGE₂. O fato que o octanoato de α e β -amirina exibiu efeito anti-hiperalgésico, tanto térmico quanto mecânico, somente

em relação à BK e ao PMA pode explicar, ao menos parcialmente, a habilidade deste composto em interagir com a via da PKC. Esta sugestão é reforçada, pelo fato que a nocicepção causada pelo carragenina, formalina e ácido acético são sensíveis a inibidores ou a deleção gênica da PKA e/ou da PKC (Malmberg, Brandon *et al.*, 1997; Khasar, Lin *et al.*, 1999). Além disso, dados da literatura mostram que os triterpenos α e β -amirina podem interagir tanto com a PKA quanto com a PKC (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005). Sendo assim, para avaliar mais diretamente a possível interação do octanoato de α e β -amirina com a via da proteína quinase C, nós utilizamos a nocicepção induzida pelo PMA, juntamente com a avaliação da migração da PKC do citosol para a membrana através da técnica de western blot.

O PMA (miristato-acetato de forbol), como outros ésteres de forbol se liga a vários subtipos de PKCs (α , β I-II, γ , δ I-III, ϵ , η , θ I-II, ζ , λ) e estimula a atividade catalítica da quinase. Para que a PKC se torne ativa, é necessário que ocorra sua translocação do citosol para a membrana celular (Newton, 2001; Ferreira *et al.*, 2005) onde irá desempenhar seu papel de quinase. Dessa forma, a quantidade de PKC encontrada na membrana celular em comparação com a encontrada no citosol vem sendo utilizado como indicativo de sua ativação (Cesare *et al.*, 1999). Dessa forma, nós investigamos o papel da PKC na ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina. Sendo assim, foi mostrado neste trabalho que a administração de PMA na pata de animais provoca grande ativação da PKC, observado pela sua translocação do citosol para a membrana celular. Além disso, o PMA também provocou pronunciado efeito nociceptivo (Ferreira *et al.*, 2005; Meotti *et al.*, 2006). O octanoato de α e β -amirina foi capaz de reduzir de forma significativa e dependente da dose a nocicepção gerada pelo PMA, reforçando a sugestão de modulação entre o octanoato de α e β -amirina e a PKC. De fato, estudos *in vitro* mostram que os triterpenos α e β -amirina são capazes de bloquear a atividade da PKC e da PKA (Hasmeda *et al.*, 1999), sendo comprovado através de estudos *in vivo*, onde foi mostrado que os triterpenos α e β -amirina aboliram a hiperalgesia mecânica induzida por ativadores tanto da PKA quanto da PKC, sendo sugerido dessa forma sua interação com essas proteínas quinases (Otuki, Ferreira *et al.*, 2005).

No entanto, podemos observar que o octanoato de α e β -amirina não causou diminuição na translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana, o que descarta a possibilidade do composto estar reduzindo a nocicepção gerada pelo PMA por inibição direta do subtipo de PKC avaliado. Um dos caminhos que a PKC ϵ modula a

nocicepção é pela ativação dos receptores TRPV1. Normalmente, o receptor TRPV1 é ativado com temperaturas elevadas, mas seguido de um dano tecidual e sua consequente fosforilação pela PKC ϵ faz com que abra o poro e permita o influxo de cátions em temperaturas não nocivas, acarretando em hiperalgesia (Bhave *et al.*, 2003; Velazquez *et al.*, 2007). De fato, o efeito nociceptivo provocado pelo PMA parece ser em grande parte gerado pela sensibilização dos receptores TRPV1 (Bolcskei *et al.*, 2005). Além disso, inibidores específicos para a PKC também reduzem a nocicepção gerada pelo PMA (Ferreira *et al.*, 2005). Embora, o octanoato de α e β -amirina não tenha interferido especificamente com a ativação da PKC ϵ , ele pode estar modulando outras proteínas quinases, como a PKC γ importante para a sensibilização do TRPV1 e do NMDA ou outros membros da família da PKC.

Como anteriormente descrito, a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina produz um pronunciado efeito antinociceptivo, embora, aparentemente não interfira com a translocação da PKC ϵ do citosol para a membrana. Além disso, estudos prévios têm demonstrado o envolvimento do receptor TRPV1 nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Ikeda *et al.*, 2001). Em adição, outros mediadores inflamatórios como a BK, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , TNF- α e IL-6, são liberadas na cavidade peritoneal por células endoteliais e células residentes localizadas no peritônio (Ribeiro *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001). De fato, a ativação dessas células e a liberação de vários mediadores inflamatórios estão presentes em alguns dos modelos empregados neste trabalho, assim, este estudo também teve por objetivo verificar a possível atividade antiinflamatória do octanoato de α e β -amirina.

A inflamação aguda é caracterizada por um aumento na permeabilidade vascular e infiltração celular, levando a formação de edema como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas, além do acúmulo de leucócitos no local da lesão (Gabay *et al.*, 1999). Um modelo que vem sendo utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória de novos compostos e é caracterizado por induzir uma resposta inflamatória persistente, é a administração de carragenina na pata de animais (Nantel *et al.*, 1999; Passos *et al.*, 2007; Mariotto *et al.*, 2008). Este modelo é conhecido por induzir a formação de edema em duas fases (Henriques *et al.*, 1987), a primeira fase se desenvolve nas 6 horas iniciais e é conhecido por produzir um edema de pouca intensidade, seguindo pela segunda fase que começa em torno

de 24 horas após a administração de carragenina e mostra uma pronunciada formação de edema, com efeito máximo entre 48 e 72 horas (Posadas *et al.*, 2004).

A resposta edematogênica produzida pela carragenina pode ser resultante de inúmeros mediadores inflamatórios liberados, como histamina, serotonina e bradicinina, e subseqüentemente sustentado pela liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, produzidos principalmente pelas isoformas de ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), respectivamente, bem como por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (Di Rosa e Willoughby, 1971; Nantel *et al.*, 1999; Posadas *et al.*, 2004). Além disso, estes mediadores contribuem para a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (quimiotaxia). De fato, Henriques e colaboradores (1987) demonstraram por análise histológica da pata de camundongos, que ocorreu um aumento na quantidade de células polimorfonucleares após 4 horas da administração de carragenina.

Foi observado neste trabalho que a administração intraplantar de carragenina em camundongos causou significativa formação de edema, iniciando 30 min após sua administração e se mantendo por 24 horas. Como descrito anteriormente, foi observado também um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α encontradas na pata. Além disso, os níveis de mieloperoxidase também se mostraram elevados, sendo este parâmetro indicativo de migração leucocitária, principalmente de neutrófilos. De fato, a enzima mieloperoxidase é encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos e em outras células da linhagem mielóide, o qual é comumente utilizada como índice de infiltração de granulócitos, e sua inibição é indicativo de atividade antiinflamatória (Bradley *et al.*, 1982; Ajuebor *et al.*, 2000).

No presente trabalho, o tratamento sistêmico com octanoato de α e β -amirina produziu uma inibição proeminente e dependente da dose do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos. Adicionalmente, o mesmo tratamento também foi capaz de reduzir os níveis de mieloperoxidase na pata de camundongos, outra importante característica deste modelo inflamatório. Além disso, os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento com octanoato de α e β -amirina foi efetivo em reduzir os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β , embora não tenha alterado os níveis da citocina TNF- α na pata de camundongos.

A carragenina é um poderoso agente inflamatório, e essas características são muitas vezes proporcionadas pelos inúmeros mediadores liberados no local da administração. No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que o efeito

inflamatório provocado pela carragenina é principalmente gerado pela bradicinina (Saleh *et al.*, 1997). Sabe-se que o papel inflamatório da bradicinina ocorre, ao menos em parte, pela ativação da PKC e posteriormente sensibilização do receptor TRPV1, que conseqüentemente facilita a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios pela entrada de cálcio nas células (Mizumura *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que a administração de inibidores da PKC causam diminuição na resposta hiperalgésica provocada pela carragenina em ratos (Khasar, Lin *et al.*, 1999).

Adicionalmente, nossos resultados vão ao encontro com dados da literatura que mostram que a aplicação tópica da α -amirina resultou em inibição de três eventos inflamatórios importantes, ou seja, a formação de edema, a migração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e a diminuição nos níveis de citocina IL-1 β (Otuki, Vieira-Lima *et al.*, 2005). Dessa forma, o mecanismo de ação no qual o octanoato de α e β -amirina reduziu os mesmos parâmetros inflamatórios, poderia ser semelhante ao observado com a α -amirina. Além disso, trabalhos têm mostrado que a PKC e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) tem profunda importância na expressão de IL-1 β (Romanelli *et al.*, 1990; Pacifici *et al.*, 1994). Bem como a estimulação da PKC induz a ativação do fator transcricional (AP-1) o qual atua como um gene promotor para a expressão da IL-1 β (Romanelli *et al.*, 1990; Ritzenthaler *et al.*, 1998). Estes dados poderiam explicar a redução nos níveis de IL-1 β após o tratamento com o octanoato de α e β -amirina.

Confirmando dados da literatura, o pré-tratamento com indometacina, um antiinflamatório não esteroide, aboliu quase totalmente o edema. Além disso, a indometacina, como outros AINEs, produzem efeitos anti-edematogênicos no modelo de edema de pata induzido pela carragenina (Henriques *et al.*, 1987). Como descrito por (Pinheiro *et al.*, 2002), nós observamos que o pré-tratamento com indometacina diminuiu os níveis de IL-1 β encontrada no tecido, bem como, reduziu os níveis de mieloperoxidase, embora também não tenha modificado os níveis de TNF- α encontrados na pata de camundongos.

Para confirmar os resultados apresentados pelo octanoato de α e β -amirina na redução do edema de pata induzido pela carragenina, nós utilizamos outro modelo bem estabelecido para avaliar o possível efeito antiinflamatório de novos agentes, a pleurisia induzida pela administração intrapleural de carragenina

(Henriques *et al.*, 1990; Pereira *et al.*, 2006). Como o edema de pata, a pleurisia induzida pela carragenina tem sido extensivamente utilizada para investigar mecanismos envolvidos na inflamação aguda e também para investigar a efetividade de compostos com propriedades antiinflamatórias (Di Rosa, Giroud *et al.*, 1971; Vinegar *et al.*, 1973). Semelhante ao edema de pata, já foi demonstrado que a administração de carragenina na cavidade pleural de camundongos induz uma resposta inflamatória bifásica, com aumento significativo no número total de leucócitos e expressivo aumento no extravasamento plasmático (Henriques *et al.*, 1990).

Sendo assim, foi confirmado e estendido os dados da literatura, mostrando que a administração de carragenina na pleura de camundongos causou significativo aumento na exsudação, avaliado pela intensidade da coloração do azul de Evans, 4 horas após a administração de carragenina. O azul de Evans é um corante que se liga fortemente a albumina plasmática e desaparece muito lentamente, sendo utilizado para avaliar indiretamente o extravasamento de proteínas do plasma para o tecido (Pereira *et al.*, 2006; Lucena *et al.*, 2007). O extravasamento plasmático foi seguido por intensa migração de células inflamatórias para a cavidade pleural e pelo aumento na atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão.

De forma interessante, o tratamento sistêmico com octanoato de α e β -amirina reduziu significativamente e de forma dependente da dose a migração de leucócitos totais para a cavidade pleural, bem como, de células polimorfonucleares, observada tanto pela contagem dessas células na cavidade pleural, quanto pela diminuição nos níveis de mieloperoxidase no pulmão, embora o mesmo tratamento não tenha sido efetivo em diminuir o número de células mononucleares e o extravasamento plasmático.

Como demonstrado na literatura (Pereira *et al.*, 2006), a administração subcutânea de dexametasona reduziu significativamente a migração de leucócitos totais e células polimorfonucleares para a cavidade pleural, assim como diminuiu também os níveis de mieloperoxidase no pulmão e o extravasamento plasmático. No entanto, a dexametasona não alterou a quantidade de células mononucleares presentes no exsudato. De fato, antiinflamatórios esteroidais, como os glicocorticóides alteram a expressão de moléculas de adesão, mediadores pró-inflamatórios e de uma forma geral reduzem muitos sinais característicos do processo inflamatório (Goulding, 2004; Caramori *et al.*, 2005).

Muitos triterpenos pentacíclicos com estruturas semelhantes ao octanoato de α e β -amirina apresentaram atividade antiinflamatória, podendo existir algum ponto em comum na molécula que proporcione essas propriedades antiinflamatórias (Recio *et al.*, 1995; Yasukawa *et al.*, 1996; Baricevic *et al.*, 2001; Tapondjou *et al.*, 2003). Embora o mecanismo de ação antiinflamatória de alguns desses triterpenos já estejam estabelecidos, os resultados a respeito do papel antiinflamatório do octanoato de α e β -amirina não nos permitem propor um mecanismo de ação preciso para tal efeito. Um ou mais alvos que não foram estudados neste trabalho poderiam estar envolvidos, como o envolvimento das ciclooxigenases-1 e 2 e outras proteínas fundamentais para a resposta inflamatória, bem como a interação com fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NF-kB) ou a modulação da liberação de citocinas, quimiocinas ou moléculas de adesão (Calixto *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2004).

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram claramente que o octanoato de α e β -amirina exerce efeito antinociceptivo rápido e de longa duração, bem como tem um perfil de resposta diretamente relacionado à dose, quando avaliados em modelos de nocicepção química em camundongos (ácido acético, capsaicina, glutamato e SP), bem como pronunciado efeito anti-hiperalgésico (térmico) e (mecânico) em ratos. Interessantemente, o octanoato de α e β -amirina apresentou atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata e pleurisia induzidas pela carragenina, reduzindo a migração celular e a liberação de IL-1 β . O mecanismo de ação para esses efeitos ainda não está totalmente elucidado, necessitando de mais estudos, contudo, o efeito parece não estar relacionado com a proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina pertussis, mecanismos opióides, serotoninérgicos, α_2 -adrenérgicos e colinérgicos, mas envolve, porém, ao menos em parte, uma interação com as fibras sensíveis a capsaicina sem interferir diretamente com a PKC ϵ . Em síntese, pode se observar mais adiante o provável mecanismo de ação do octanoato de α e β -amirina.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O octanoato de α e β -amirina apresenta efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina, glutamato e capsaicina em camundongos;
- O efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina é dependente das fibras aferentes sensíveis a capsaicina;
- O octanoato de α e β -amirina apresenta propriedades antihiperalgésicas somente quando induzida pela bradicinina e pelo PMA, mas não pela PGE₂, o que poderia indicar a participação da PKC;
- O octanoato de α e β -amirina apresenta efeito antinociceptivo tanto quando administrado perifericamente quanto sistemicamente, e estes efeitos parecem envolver ao menos em parte a modulação de receptores TRPV1 ou algum membro da família da PKC, menos a PKC ϵ ;
- O octanoato de α e β -amirina apresenta propriedades antiedematogênicas e antiinflamatórias no modelo de edema e pleurisia de pata induzidos pela carragenina;
- O octanoato de α e β -amirina reduziu a migração de células inflamatórias e os níveis de IL-1 β no local da inflamação;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ahluwalia, J., H. Rang e I. Nagy. The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. Eur J Neurosci, v.16, n.8, Oct, p.1483-9. 2002.
- Ajuebor, M. N., A. Singh e J. L. Wallace. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.279, n.1, Jul, p.G238-44. 2000.
- Alhaider, A. A., S. Z. Lei e G. L. Wilcox. Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. J Neurosci, v.11, n.7, Jul, p.1881-8. 1991.
- Almeida, T. F., S. Roizenblatt e S. Tufik. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain Res, v.1000, n.1-2, Mar 12, p.40-56. 2004.
- Andrade, E. L., A. P. Luiz, J. Ferreira e J. B. Calixto. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. Neuroscience, v.152, n.2, Mar 18, p.511-20. 2008.
- Aragao, G. F., L. M. Carneiro, A. P. Junior, L. C. Vieira, P. N. Bandeira, T. L. Lemos e G. S. Viana. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Pharmacol Biochem Behav, v.85, n.4, Dec, p.827-34. 2006.
- Aragao, G. F., M. C. Cunha Pinheiro, P. Nogueira Bandeira, T. L. Gomes Lemos e G. S. De Barros Viana. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. J Herb Pharmacother, v.7, n.2, p.31-47. 2007.
- Bandler, R. e K. A. Keay. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. Prog Brain Res, v.107, p.285-300. 1996.
- Baricevic, D., S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, B. Simonovska, A. Krasna e A. Zupancic. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. J Ethnopharmacol, v.75, n.2-3, May, p.125-32. 2001.
- Bear, M. F. C., B.W. Paradiso, M.A. Neurociências: Desvendando o sistema nervoso. n.2, p.422. 2006.
- Beecher, H. K. Generalization from pain of various types and diverse origins. Science, v.130, n.3370, Jul 31, p.267-8. 1959.
- Beirith, A., A. R. Santos e J. B. Calixto. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. Brain Res, v.924, n.2, Jan 11, p.219-28. 2002.

_____. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. Brain Res, v.969, n.1-2, Apr 18, p.110-6. 2003.

Belmonte, C. e F. Viana. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. Mol Pain, v.4, p.14. 2008.

Bentley, R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. Perspect Biol Med, v.48, n.3, Summer, p.444-52. 2005.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1610-5. 1999.

Bhave, G., H. J. Hu, K. S. Glauner, W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford e R. W. T. Gereau. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.21, Oct 14, p.12480-5. 2003.

Bhave, G., W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford e R. W. T. Gereau. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. Neuron, v.35, n.4, Aug 15, p.721-31. 2002.

Bleakman, D., A. Alt e E. S. Nisenbaum. Glutamate receptors and pain. Semin Cell Dev Biol, v.17, n.5, Oct, p.592-604. 2006.

Boie, Y., R. Stocco, N. Sawyer, D. M. Slipetz, M. D. Ungrin, F. Neuschafer-Rube, G. P. Puschel, K. M. Metters e M. Abramovitz. Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. Eur J Pharmacol, v.340, n.2-3, Dec 11, p.227-41. 1997.

Bolcskei, K., Z. Helyes, A. Szabo, K. Sandor, K. Elekes, J. Nemeth, R. Almasi, E. Pinter, G. Petho e J. Szolcsanyi. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. Pain, v.117, n.3, Oct, p.368-76. 2005.

Bouvier, M. M., M. L. Evans e C. D. Benham. Calcium Influx Induced by Stimulation of ATP Receptors on Neurons Cultured from Rat Dorsal Root Ganglia. Eur J Neurosci, v.3, n.3, p.285-291. 1991.

Bradley, P. P., D. A. Priebe, R. D. Christensen e G. Rothstein. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol, v.78, n.3, Mar, p.206-9. 1982.

Brauchi, S., G. Orta, C. Mascayano, M. Salazar, N. Raddatz, H. Urbina, E. Rosenmann, F. Gonzalez-Nilo e R. Latorre. Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.24, Jun 12, p.10246-51. 2007.

Brochu, S., M. Olivier e S. Rivest. Neuronal activity and transcription of proinflammatory cytokines, IkappaBalpha, and iNOS in the mouse brain during acute

endotoxemia and chronic infection with *Trypanosoma brucei brucei*. J Neurosci Res, v.57, n.6, Sep 15, p.801-16. 1999.

Buerkle, H. e T. L. Yaksh. Pharmacological evidence for different alpha 2-adrenergic receptor sites mediating analgesia and sedation in the rat. Br J Anaesth, v.81, n.2, Aug, p.208-15. 1998.

Burgess, G. M., I. Mullaney, M. Mcneill, P. M. Dunn e H. P. Rang. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. J Neurosci, v.9, n.9, Sep, p.3314-25. 1989.

Burgess, P. R. e E. R. Perl. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. J Physiol, v.190, n.3, Jun, p.541-62. 1967.

Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. J Nat Prod, v.67, n.12, Dec, p.2141-53. 2004.

Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. J Ethnopharmacol, v.100, n.1-2, Aug 22, p.131-4. 2005.

Calixto, J. B., M. M. Campos, M. F. Otuki e A. R. Santos. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med, v.70, n.2, Feb, p.93-103. 2004.

Calixto, J. B., M. F. Otuki e A. R. Santos. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Planta Med, v.69, n.11, Nov, p.973-83. 2003.

Campos, M. M., G. E. De Souza, N. D. Ricci, J. L. Pesquero, M. M. Teixeira e J. B. Calixto. The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. Br J Pharmacol, v.135, n.5, Mar, p.1107-14. 2002.

Caramori, G. e I. Adcock. Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, v.4, n.4, Aug, p.455-63. 2005.

Carlton, S. C., R. Nociceptive integration: does it have a peripheral component. Pain Forum, v.7, p.71-78. 1998.

Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum e D. Julius. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science, v.288, n.5464, Apr 14, p.306-13. 2000.

Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake e D. Julius. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. Nature, v.398, n.6726, Apr 1, p.436-41. 1999.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine e D. Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, v.389, n.6653, Oct 23, p.816-24. 1997.

- Cesare, P., L. V. Dekker, A. Sardini, P. J. Parker e P. A. Mcnaughton. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. Neuron, v.23, n.3, Jul, p.617-24. 1999.
- Cesare, P. e P. Mcnaughton. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.26, Dec 24, p.15435-9. 1996.
- Chadalapaka, G., I. Jutooru, A. Mcalees, T. Stefanac e S. Safe. Structure-dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives. Bioorg Med Chem Lett, v.18, n.8, Apr 15, p.2633-9. 2008.
- Chapman, C. R. e J. Gavrin. Suffering: the contributions of persistent pain. Lancet, v.353, n.9171, Jun 26, p.2233-7. 1999.
- Chen, L. e L. Y. Huang. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. Nature, v.356, n.6369, Apr 9, p.521-3. 1992.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao e D. Julius. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. Nature, v.411, n.6840, Jun 21, p.957-62. 2001.
- Cockayne, D. A., S. G. Hamilton, Q. M. Zhu, P. M. Dunn, Y. Zhong, S. Novakovic, A. B. Malmberg, G. Cain, A. Berson, L. Kassotakis, L. Hedley, W. G. Lachnit, G. Burnstock, S. B. McMahon e A. P. Ford. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. Nature, v.407, n.6807, Oct 26, p.1011-5. 2000.
- Coderre, T. J. e K. Yashpal. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. Eur J Neurosci, v.6, n.8, Aug 1, p.1328-34. 1994.
- Coffield, J. A., K. K. Bowen e V. Miletic. Retrograde tracing of projections between the nucleus submedius, the ventrolateral orbital cortex, and the midbrain in the rat. J Comp Neurol, v.321, n.3, Jul 15, p.488-99. 1992.
- Coleman, R. A., Smith, W. L. And Narumiya, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. Pharmac. Rev, v.46, p.205-229. 1994.
- Collier, H. O., L. C. Dinneen, C. A. Johnson e C. Schneider. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br J Pharmacol Chemother, v.32, n.2, Feb, p.295-310. 1968.

- Collins, D. R. e S. N. Davies. Arachidonic acid metabolites and the synaptic potentiation evoked by activation of metabotropic glutamate receptors. Eur J Pharmacol, v.342, n.2-3, Jan 26, p.213-6. 1998.
- Corrêa, P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. . Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brazil, v.1, p.82. 1984.
- Coutaux, A., F. Adam, J. C. Willer e D. Le Bars. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. Joint Bone Spine, v.72, n.5, Oct, p.359-71. 2005.
- Craig, A. D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. Annu Rev Neurosci, v.26, p.1-30. 2003.
- Cui, M., P. Honore, C. Zhong, D. Gauvin, J. Mikusa, G. Hernandez, P. Chandran, A. Gomtsyan, B. Brown, E. K. Bayburt, K. Marsh, B. Bianchi, H. McDonald, W. Niforatos, T. R. Neelands, R. B. Moreland, M. W. Decker, C. H. Lee, J. P. Sullivan e C. R. Faltynek. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. J Neurosci, v.26, n.37, Sep 13, p.9385-93. 2006.
- Cunha, F. Q., M. M. Teixeira e S. H. Ferreira. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. Br J Pharmacol, v.127, n.3, Jun, p.671-8. 1999.
- De Campos, R. O., A. R. Santos, Z. R. Vaz, T. R. Pinheiro, M. G. Pizzolatti, V. Cechinel Filho, F. Delle Monache, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). Life Sci, v.61, n.16, p.1619-30. 1997.
- Debock, F., J. Kurz, S. C. Azad, C. G. Parsons, G. Hapfelmeier, W. Zieglgansberger e G. Rammes. Alpha2-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of Gi/o-protein-mediated modulation of Ca²⁺-channels and inwardly rectifying K⁺-channels in LTD. Eur J Neurosci, v.17, n.7, Apr, p.1411-24. 2003.
- Dhaka, A., V. Viswanath e A. Patapoutian. TRP Ion Channels and Temperature Sensation. Annu Rev Neurosci, Mar 15. 2006.
- Di Rosa, M., J. P. Giroud e D. A. Willoughby. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. J Pathol, v.104, n.1, May, p.15-29. 1971.
- Di Rosa, M. e D. A. Willoughby. Screens for anti-inflammatory drugs. J Pharm Pharmacol, v.23, n.4, Apr, p.297-8. 1971.
- Djoughri, L. e S. N. Lawson. A-beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. Brain Res Brain Res Rev, v.46, n.2, Oct, p.131-45. 2004.

- Dray, A., J. Bettaney, P. Forster e M. N. Perkins. Bradykinin-induced stimulation of afferent fibres is mediated through protein kinase C. Neurosci Lett, v.91, n.3, Sep 12, p.301-7. 1988.
- England, S., S. Bevan e R. J. Docherty. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. J Physiol, v.495 (Pt 2), Sep 1, p.429-40. 1996.
- Ferreira, J., G. L. Da Silva e J. B. Calixto. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. Br J Pharmacol, v.141, n.5, Mar, p.787-94. 2004.
- Ferreira, J., K. M. Triches, R. Medeiros e J. B. Calixto. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. Pain, v.117, n.1-2, Sep, p.171-81. 2005.
- Fundytus, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. CNS Drugs, v.15, n.1, Jan, p.29-58. 2001.
- Gabay, C. e I. Kushner. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med, v.340, n.6, Feb 11, p.448-54. 1999.
- Gnoatto, S. C., L. Dalla Vecchia, C. L. Lencina, A. Dassonville-Klimpt, S. Da Nascimento, D. Mossalayi, J. Guillon, G. Gosmann e P. Sonnet. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. J Enzyme Inhib Med Chem, v.23, n.5, Oct, p.604-10. 2008.
- Goulding, N. J. The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus. Curr Opin Pharmacol, v.4, n.6, Dec, p.629-36. 2004.
- Griffis, C. A., P. Compton e L. Doering. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. Biol Res Nurs, v.7, n.4, Apr, p.297-312. 2006.
- Grundy, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. Gut, v.51 Suppl 1, Jul, p.i2-5. 2002.
- Gullo, V. P., J. Mcalpine, K. S. Lam, D. Baker e F. Petersen. Drug discovery from natural products. J Ind Microbiol Biotechnol, v.33, n.7, Jul, p.523-31. 2006.
- Haddad, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. Biochem Biophys Res Commun, v.353, n.2, Feb 9, p.217-24. 2007.
- Hall, J. M. Bradykinin receptors. Gen Pharmacol, v.28, n.1, Jan, p.1-6. 1997.
- Hargreaves, K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores e J. Joris. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain, v.32, n.1, Jan, p.77-88. 1988.

Hasmeda, M., G. Kweifio-Okai, T. Macrides e G. M. Polya. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. Planta Med, v.65, n.1, Feb, p.14-8. 1999.

Henriques, M. G., P. M. Silva, M. A. Martins, C. A. Flores, F. Q. Cunha, J. Assreuy-Filho e R. S. Cordeiro. Mouse paw edema. A new model for inflammation? Braz J Med Biol Res, v.20, n.2, p.243-9. 1987.

Henriques, M. G., V. B. Weg, M. A. Martins, P. M. Silva, P. D. Fernandes, R. S. Cordeiro e B. B. Vargaftig. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. Br J Pharmacol, v.99, n.1, Jan, p.164-8. 1990.

Holanda Pinto, S. A., L. M. Pinto, G. M. Cunha, M. H. Chaves, F. A. Santos e V. S. Rao. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. Inflammopharmacology, v.16, n.1, Feb, p.48-52. 2008.

Holzer, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. Adv Exp Med Biol, v.298, p.3-16. 1991.

Honda, T., B. V. Rounds, L. Bore, H. J. Finlay, F. G. Favaloro, Jr., N. Suh, Y. Wang, M. B. Sporn e G. W. Gribble. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. J Med Chem, v.43, n.22, Nov 2, p.4233-46. 2000.

Huerre, M. R. e P. Gounon. Inflammation: patterns and new concepts. Res Immunol, v.147, n.7, Sep, p.417-34. 1996.

Hunskar, S. e K. Hole. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain, v.30, n.1, Jul, p.103-14. 1987.

Hunt, S. P. e P. W. Mantyh. The molecular dynamics of pain control. Nat Rev Neurosci, v.2, n.2, Feb, p.83-91. 2001.

Hwang, S. W., H. Cho, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, K. H. Min, Y. G. Suh, D. Kim e U. Oh. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.11, May 23, p.6155-60. 2000.

Hylden, J. L. e G. L. Wilcox. Intrathecal morphine in mice: a new technique. Eur J Pharmacol, v.67, n.2-3, Oct 17, p.313-6. 1980.

Ikeda, Y., A. Ueno, H. Naraba e S. Oh-Ishi. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. Life Sci, v.69, n.24, Nov 2, p.2911-9. 2001.

Jancso, G. Selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones induced by capsaicin: glial changes. Cell Tissue Res, v.195, n.1, Dec 14, p.145-52. 1978.

- Jhaveri, M. D., S. J. Elmes, D. A. Kendall e V. Chapman. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naive, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. Eur J Neurosci, v.22, n.2, Jul, p.361-70. 2005.
- Ji, R. R. e C. J. Woolf. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. Neurobiol Dis, v.8, n.1, Feb, p.1-10. 2001.
- Johann, S., C. Soldi, J. P. Lyon, M. G. Pizzolatti e M. A. Resende. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. Lett Appl Microbiol, v.45, n.2, Aug, p.148-53. 2007.
- Jones, P. G. e J. Dunlop. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. Neuropharmacology, v.53, n.2, Aug, p.197-206. 2007.
- Joshi, S. K., P. Honore, G. Hernandez, R. Schmidt, A. Gomtsyan, M. Scanio, M. Kort e M. F. Jarvis. Additive Antinociceptive Effects of the Selective Nav1.8 Blocker A-803467 and Selective TRPV1 Antagonists in Rat Inflammatory and Neuropathic Pain Models. J Pain, Dec 11. 2008.
- Julius, D. e A. I. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.
- Khan, A. A., S. N. Raja, D. C. Manning, J. N. Campbell e R. A. Meyer. The effects of bradykinin and sequence-related analogs on the response properties of cutaneous nociceptors in monkeys. Somatosens Mot Res, v.9, n.2, p.97-106. 1992.
- Khasar, S. G., Y. H. Lin, A. Martin, J. Dadgar, T. McMahon, D. Wang, B. Hundle, K. O. Aley, W. Isenberg, G. Mccarter, P. G. Green, C. W. Hodge, J. D. Levine e R. O. Messing. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. Neuron, v.24, n.1, Sep, p.253-60. 1999.
- Khasar, S. G., G. Mccarter e J. D. Levine. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. J Neurophysiol, v.81, n.3, Mar, p.1104-12. 1999.
- Koster, R. A., M.; De Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening. Fed. Proc., v.18, p.412. 1959.
- Krishtal, O. A., S. M. Marchenko e A. G. Obukhov. Cationic channels activated by extracellular ATP in rat sensory neurons. Neuroscience, v.27, n.3, Dec, p.995-1000. 1988.
- Kumazawa, T., K. Mizumura, H. Koda e H. Fukusako. EP receptor subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. J Neurophysiol, v.75, n.6, Jun, p.2361-8. 1996.

- Kuraishi, Y., N. Hirota, Y. Sato, N. Hanashima, H. Takagi e M. Satoh. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. Neuroscience, v.30, n.1, p.241-50. 1989.
- Laflamme, N., S. Lacroix e S. Rivest. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. J Neurosci, v.19, n.24, Dec 15, p.10923-30. 1999.
- Lang, E., A. Novak, P. W. Reeh e H. O. Handwerker. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. J Neurophysiol, v.63, n.4, Apr, p.887-901. 1990.
- Lawson, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. Exp Physiol, v.87, n.2, Mar, p.239-44. 2002.
- Le Bars, D., M. Gozariu e S. W. Cadden. Animal models of nociception. Pharmacol Rev, v.53, n.4, Dec, p.597-652. 2001.
- Lee, S. D., B. D. Lee, Y. Kim, P. G. Suh e S. H. Ryu. Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. Neurosci Lett, v.294, n.2, Nov 17, p.130-2. 2000.
- Lever, I. J., E. J. Bradbury, J. R. Cunningham, D. W. Adelson, M. G. Jones, S. B. McMahon, J. C. Marvizon e M. Malcangio. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. J Neurosci, v.21, n.12, Jun 15, p.4469-77. 2001.
- Levesque, H. e O. Lafont. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. Rev Med Interne, v.21 Suppl 1, Mar, p.8s-17s. 2000.
- Levitan, I. B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. Annu Rev Physiol, v.56, p.193-212. 1994.
- Lima-Junior, R. C., F. A. Oliveira, L. A. Gurgel, I. J. Cavalcante, K. A. Santos, D. A. Campos, C. A. Vale, R. M. Silva, M. H. Chaves, V. S. Rao e F. A. Santos. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. Planta Med, v.72, n.1, Jan, p.34-9. 2006.
- Lima-Junior, R. C., D. I. Sousa, G. A. Brito, G. M. Cunha, M. H. Chaves, V. S. Rao e F. A. Santos. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. Inflamm Res, v.56, n.12, Dec, p.487-94. 2007.
- Llorca, P. M., G. Reine e M. A. Wolf. [Mechanism of action of antidepressants]. Can J Psychiatry, v.38, n.10, Dec, p.649-56. 1993.

Loeser, J. D. e R. Melzack. Pain: an overview. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1607-9. 1999.

Loeser, J. D. e R. D. Treede. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain, v.137, n.3, Jul 31, p.473-7. 2008.

Lombardino, J. G. e J. A. Lowe, 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. Nat Rev Drug Discov, v.3, n.10, Oct, p.853-62. 2004.

Lucena, G. M., V. M. Gadotti, L. C. Maffi, G. S. Silva, M. S. Azevedo e A. R. Santos. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. J Ethnopharmacol, v.112, n.1, May 30, p.19-25. 2007.

Ma, W. e R. Quirion. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. Expert Opin Ther Targets, v.11, n.3, Mar, p.307-20. 2007.

Maciel, M. A. M., Pinto, A.C., Veiga, V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A. . Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim Nova, v.25, p.429-438. 2002.

Malmberg, A. B., E. P. Brandon, R. L. Idzerda, H. Liu, G. S. Mcknight e A. I. Basbaum. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. J Neurosci, v.17, n.19, Oct 1, p.7462-70. 1997.

Malmberg, A. B., C. Chen, S. Tonegawa e A. I. Basbaum. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. Science, v.278, n.5336, Oct 10, p.279-83. 1997.

Malmberg, A. B. e T. L. Yaksh. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. J Neurosci, v.15, n.4, Apr, p.2768-76. 1995.

Manning, D. C., S. N. Raja, R. A. Meyer e J. N. Campbell. Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. Clin Pharmacol Ther, v.50, n.6, Dec, p.721-9. 1991.

Marceau, F. Kinin B1 receptors: a review. Immunopharmacology, v.30, n.1, Jun, p.1-26. 1995.

Marceau, F. e D. R. Bachvarov. Kinin receptors. Clin Rev Allergy Immunol, v.16, n.4, Winter, p.385-401. 1998.

Mariotto, S., E. Esposito, R. Di Paola, A. Ciampa, E. Mazzon, A. C. De Prati, E. Darra, S. Vincenzi, G. Cucinotta, R. Caminiti, H. Suzuki e S. Cuzzocrea. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. Pharmacol Res, v.57, n.2, Feb, p.110-24. 2008.

Matsuka, Y., J. K. Neubert, N. T. Maidment e I. Spigelman. Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. Brain Res, v.915, n.2, Oct 12, p.248-55. 2001.

Matsumura, K., Y. Watanabe, H. Onoe e Y. Watanabe. Prostacyclin receptor in the brain and central terminals of the primary sensory neurons: an autoradiographic study using a stable prostacyclin analogue [³H]iloprost. Neuroscience, v.65, n.2, Mar, p.493-503. 1995.

Mccall, W. D., K. D. Tanner e J. D. Levine. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. Neurosci Lett, v.208, n.1, Apr 12, p.45-8. 1996.

Mccleskey, E. W. e M. S. Gold. Ion channels of nociception. Annu Rev Physiol, v.61, p.835-56. 1999.

Mcguirk, S. M. e A. C. Dolphin. G-protein mediation in nociceptive signal transduction: an investigation into the excitatory action of bradykinin in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. Neuroscience, v.49, n.1, Jul, p.117-28. 1992.

Mckemy, D. D., W. M. Neuhausser e D. Julius. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature, v.416, n.6876, Mar 7, p.52-8. 2002.

Medeiros, R., M. F. Otuki, M. C. Avellar e J. B. Calixto. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Eur J Pharmacol, v.559, n.2-3, Mar 22, p.227-35. 2007.

Medvedeva, Y. V., M. S. Kim e Y. M. Usachev. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. J Neurosci, v.28, n.20, May 14, p.5295-311. 2008.

Melzack, R. W., P.D. Textbook of pain. Edinburgh: Churchill Livingstone. p.1152. 1999.

Mendes, G. L., A. R. Santos, A. Malheiros, V. C. Filho, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. J Pharmacol Exp Ther, v.292, n.1, Jan, p.164-72. 2000.

Meng, Y. Q., D. Liu, L. L. Cai, H. Chen, B. Cao e Y. Z. Wang. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. Bioorg Med Chem, Nov 20. 2008.

Meotti, F. C., R. Fachineto, L. C. Maffi, F. C. Missau, M. G. Pizzolatti, J. B. Rocha e A. R. Santos. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. Eur J Pharmacol, v.567, n.3, Jul 19, p.198-205. 2007.

Meotti, F. C., A. P. Luiz, M. G. Pizzolatti, C. A. Kassuya, J. B. Calixto e A. R. Santos. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of

the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.316, n.2, Feb, p.789-96. 2006.

Militzer, K. [Histometrical studies on induced paw inflammation by carrageenan and Freund's complete adjuvant in rats]. Arzneimittelforschung, v.25, n.12, p.1884-9. 1975.

Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol, v.57, n.1, Jan, p.1-164. 1999.

Mitchell, J. A., S. Larkin e T. J. Williams. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. Biochem Pharmacol, v.50, n.10, Nov 9, p.1535-42. 1995.

Mizumura, K., T. Sugiur, H. Koda, K. Katanosaka, B. R. Kumar, R. Giron e M. Tominaga. [Pain and Bradykinin Receptors--sensory transduction mechanism in the nociceptor terminals and expression change of bradykinin receptors in inflamed condition]. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, v.25, n.1, Feb, p.33-8. 2005.

Monastyrskaya, K., A. Hostettler, S. Buergi e A. Draeger. The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. J Biol Chem, v.280, n.8, Feb 25, p.7135-46. 2005.

Morton, C. R., W. D. Hutchison e I. A. Hendry. Release of immunoreactive somatostatin in the spinal dorsal horn of the cat. Neuropeptides, v.12, n.4, Nov-Dec, p.189-97. 1988.

Nantel, F., D. Denis, R. Gordon, A. Northey, M. Cirino, K. M. Metters e C. C. Chan. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. Br J Pharmacol, v.128, n.4, Oct, p.853-9. 1999.

Newton, A. C. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. Chem Rev, v.101, n.8, Aug, p.2353-64. 2001.

Nishihara, I., T. Minami, Y. Watanabe, S. Ito e O. Hayaishi. Prostaglandin E2 stimulates glutamate release from synaptosomes of rat spinal cord. Neurosci Lett, v.196, n.1-2, Aug 18, p.57-60. 1995.

Oliveira, F. A., C. L. Costa, M. H. Chaves, F. R. Almeida, I. J. Cavalcante, A. F. Lima, R. C. Lima, Jr., R. M. Silva, A. R. Campos, F. A. Santos e V. S. Rao. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. Life Sci, v.77, n.23, Oct 21, p.2942-52. 2005.

Oliveira, F. A., G. M. Vieira-Junior, M. H. Chaves, F. R. Almeida, K. A. Santos, F. S. Martins, R. M. Silva, F. A. Santos e V. S. Rao. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. Planta Med, v.70, n.8, Aug, p.780-2. 2004.

Otuki, M. F., J. Ferreira, F. V. Lima, C. Meyre-Silva, A. Malheiros, L. A. Muller, G. S. Cani, A. R. Santos, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.313, n.1, Apr, p.310-8. 2005.

Otuki, M. F., F. Vieira-Lima, A. Malheiros, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. Eur J Pharmacol, v.507, n.1-3, Jan 10, p.253-9. 2005.

Pacifici, R., J. Roman, R. Kimble, R. Civitelli, C. M. Brownfield e C. Bizzarri. Ligand binding to monocyte alpha 5 beta 1 integrin activates the alpha 2 beta 1 receptor via the alpha 5 subunit cytoplasmic domain and protein kinase C. J Immunol, v.153, n.5, Sep 1, p.2222-33. 1994.

Pasero, C. P., J. Mccafeery, M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. Em: Mccaffery & Pasero, C. Pain Clinical Manual St. Louis, MO. p.15-34. 1999.

Passos, G. F., E. S. Fernandes, F. M. Da Cunha, J. Ferreira, L. F. Pianowski, M. M. Campos e J. B. Calixto. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. J Ethnopharmacol, v.110, n.2, Mar 21, p.323-33. 2007.

Pasternak, G. W. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. Jama, v.259, n.9, Mar 4, p.1362-7. 1988.

Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. Mcintyre, S. Bevan e A. Patapoutian. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell, v.108, n.5, Mar 8, p.705-15. 2002.

Pereira, R., Y. S. Medeiros e T. S. Frode. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. Transpl Immunol, v.16, n.2, Aug, p.105-11. 2006.

Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. Curr Med Chem, v.6, n.8, Aug, p.635-64. 1999.

Phillipson, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry, v.56, n.3, Feb, p.237-43. 2001.

Pierce, P. A., G. X. Xie, T. Meuser e S. J. Peroutka. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in human dorsal root ganglia: a polymerase chain reaction study. Neuroscience, v.81, n.3, Dec, p.813-9. 1997.

Pinheiro, R. M. e J. B. Calixto. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. Inflamm Res, v.51, n.12, Dec, p.603-10. 2002.

- Pini, L. A., M. Sandrini e G. Vitale. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. Eur J Pharmacol, v.308, n.1, Jul 11, p.31-40. 1996.
- Portanova, J. P., Y. Zhang, G. D. Anderson, S. D. Hauser, J. L. Masferrer, K. Seibert, S. A. Gregory e P. C. Isakson. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. J Exp Med, v.184, n.3, Sep 1, p.883-91. 1996.
- Posadas, I., M. Bucci, F. Roviezzo, A. Rossi, L. Parente, L. Sautebin e G. Cirino. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. Br J Pharmacol, v.142, n.2, May, p.331-8. 2004.
- Premkumar, L. S. e G. P. Ahern. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. Nature, v.408, n.6815, Dec 21-28, p.985-90. 2000.
- Puig, S. e L. S. Sorkin. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. Pain, v.64, n.2, Feb, p.345-55. 1996.
- Raja, S. M., R. Campbell, J. . Peripheral neural mechanisms of nociception. Em: Wall, P. & Melzack, R. (eds). Textbook of pain New York: Churchill, Livingstone. p.2323-2350. 1999.
- Randall, L. O. e J. J. Selitto. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.111, n.4, Sep 1, p.409-19. 1957.
- Rang, H. P., S. Bevan e A. Dray. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. Br Med Bull, v.47, n.3, Jul, p.534-48. 1991.
- Rang, H. P., M. M. Dale, J. M. Ritter e P. K. Moore. Farmacologia. Elsevier USA 2003. 904 p.
- Rang, H. P. e J. M. Ritchie. Depolarization of nonmyelinated fibers of the rat vagus nerve produced by activation of protein kinase C. J Neurosci, v.8, n.7, Jul, p.2606-17. 1988.
- Recio, M. C., R. M. Giner, S. Manez e J. L. Rios. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. Planta Med, v.61, n.2, Apr, p.182-5. 1995.
- Reeh, P. W. e M. Kress. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. Curr Opin Pharmacol, v.1, n.1, Feb, p.45-51. 2001.
- Ribeiro, R. A., M. L. Vale, S. M. Thomazzi, A. B. Paschoalato, S. Poole, S. H. Ferreira e F. Q. Cunha. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. Eur J Pharmacol, v.387, n.1, Jan 3, p.111-8. 2000.

Riedel, W. e G. Neeck. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. Z Rheumatol, v.60, n.6, Dec, p.404-15. 2001.

Ritzenthaler, J. e J. Roman. Differential effects of protein kinase C inhibitors on fibronectin-induced interleukin-beta gene transcription, protein synthesis and secretion in human monocytic cells. Immunology, v.95, n.2, Oct, p.264-71. 1998.

Rodrigues, A. L., G. L. Da Silva, A. S. Mateussi, E. S. Fernandes, O. G. Miguel, R. A. Yunes, J. B. Calixto e A. R. Santos. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. Life Sci, v.70, n.12, Feb 8, p.1347-58. 2002.

Romanelli, M. F., J. C. Morris, K. Ashkin e L. A. Coben. Advanced Alzheimer's disease is a risk factor for late-onset seizures. Arch Neurol, v.47, n.8, Aug, p.847-50. 1990.

Sagawa, N., H. Fujita, Y. Banno, Y. Nozawa, H. Katoh e N. Kuzumaki. Gelsolin suppresses tumorigenicity through inhibiting PKC activation in a human lung cancer cell line, PC10. Br J Cancer, v.88, n.4, Feb 24, p.606-12. 2003.

Sakurada, T., K. Katsumata, K. Tan-No, S. Sakurada e K. Kisara. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology, v.31, n.12, Dec, p.1279-85. 1992.

Sakurada, T., T. Matsumura, T. Moriyama, C. Sakurada, S. Ueno e S. Sakurada. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.75, n.1, Apr, p.115-21. 2003.

Saleh, T. S., J. B. Calixto e Y. S. Medeiros. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. Eur J Pharmacol, v.331, n.1, Jul 16, p.43-52. 1997.

Sanchez-Prieto, J., D. C. Budd, I. Herrero, E. Vazquez e D. G. Nicholls. Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. Trends Neurosci, v.19, n.6, Jun, p.235-9. 1996.

Santos, A. R. e J. B. Calixto. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides, v.31, n.4, Aug, p.381-9. 1997a.

_____. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neurosci Lett, v.235, n.1-2, Oct 10, p.73-6. 1997b.

Santos, A. R., R. O. De Campos, O. G. Miguel, V. Cechinel-Filho, R. A. Yunes e J. B. Calixto. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. Eur J Pharmacol, v.379, n.1, Aug 20, p.7-17. 1999.

Santos, A. R., V. M. Gadotti, G. L. Oliveira, D. Tibola, A. F. Paszcuk, A. Neto, H. M. Spindola, M. M. Souza, A. L. Rodrigues e J. B. Calixto. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. Neuropharmacology, v.48, n.7, Jun, p.1021-34. 2005.

Saria, A., R. Gamse, J. Petermann, J. A. Fischer, E. Theodorsson-Norheim e J. M. Lundberg. Simultaneous release of several tachykinins and calcitonin gene-related peptide from rat spinal cord slices. Neurosci Lett, v.63, n.3, Jan 30, p.310-4. 1986.

Savinainen, J. R. e J. T. Laitinen. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. Cell Mol Neurobiol, v.24, n.2, Apr, p.243-56. 2004.

Scheidt, C., A. R. Santos, J. Ferreira, A. Malheiros, V. Cechinel-Filho, R. A. Yunes e J. B. Calixto. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. Neuropharmacology, v.43, n.3, Sep, p.340-7. 2002.

Schepelmann, K., K. Messlinger e R. F. Schmidt. The effects of phorbol ester on slowly conducting afferents of the cat's knee joint. Exp Brain Res, v.92, n.3, p.391-8. 1993.

Schmid-Schonbein, G. W. Analysis of inflammation. Annu Rev Biomed Eng, v.8, p.93-131. 2006.

Scholz, J. e C. J. Woolf. Can we conquer pain? Nat Neurosci, v.5 Suppl, Nov, p.1062-7. 2002.

Schultz, J. E. e G. J. Gross. Opioids and cardioprotection. Pharmacol Ther, v.89, n.2, Feb, p.123-37. 2001.

Sherwood, E. R. e T. Toliver-Kinsky. Mechanisms of the inflammatory response. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, v.18, n.3, Sep, p.385-405. 2004.

Siani, A. C., M. F. Ramos, O. Menezes-De-Lima, Jr., R. Ribeiro-Dos-Santos, E. Fernandez-Ferreira, R. O. Soares, E. C. Rosas, G. S. Susunaga, A. C. Guimaraes, M. G. Zoghbi e M. G. Henriques. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. J Ethnopharmacol, v.66, n.1, Jul, p.57-69. 1999.

Skilling, S. R., D. H. Smullin, A. J. Beitz e A. A. Larson. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. J Neurochem, v.51, n.1, Jul, p.127-32. 1988.

Soldi, C., M. G. Pizzolatti, A. P. Luiz, R. Marcon, F. C. Meotti, L. A. Mioto e A. R. Santos. Synthetic derivatives of the alpha- and beta-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. Bioorg Med Chem, Dec 8. 2007.

- Souza, A. L., F. A. Moreira, K. R. Almeida, C. M. Bertollo, K. A. Costa e M. M. Coelho. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. Br J Pharmacol, v.135, n.1, Jan, p.239-47. 2002.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan e A. Patapoutian. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. Cell, v.112, n.6, Mar 21, p.819-29. 2003.
- Sugimoto, T., C. Xiao e H. Ichikawa. Neonatal primary neuronal death induced by capsaicin and axotomy involves an apoptotic mechanism. Brain Res, v.807, n.1-2, Oct 5, p.147-54. 1998.
- Sutherland, S. P., S. P. Cook e E. W. McCleskey. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia. Prog Brain Res, v.129, p.21-38. 2000.
- Sweitzer, S. M., C. P. Allen, M. H. Zissen e J. J. Kendig. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. Pain, v.110, n.1-2, Jul, p.269-80. 2004.
- Sweitzer, S. M., S. M. Wong, M. C. Peters, D. Mochly-Rosen, D. C. Yeomans e J. J. Kendig. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. J Pharmacol Exp Ther, v.309, n.2, May, p.616-25. 2004.
- Szallasi, A. e P. M. Blumberg. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). Adv Pharmacol, v.24, p.123-55. 1993.
- _____. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev, v.51, n.2, Jun, p.159-212. 1999.
- Szekessy-Hermann, V. [Friedrich Wohler synthesized urea 150 years ago]. Orv Hetil, v.119, n.50, Dec 10, p.3073-5. 1978.
- Szoke, E., L. Seress e J. Szolcsanyi. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. Neuroscience, v.113, n.4, p.925-37. 2002.
- Tanachatchairatana, T., J. B. Bremner, R. Chokchaisiri e A. Suksamrarn. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. Chem Pharm Bull (Tokyo), v.56, n.2, Feb, p.194-8. 2008.
- Tapondjou, L. A., D. Lontsi, B. L. Sondengam, J. Choi, K. T. Lee, H. J. Jung e H. J. Park. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. Arch Pharm Res, v.26, n.2, Feb, p.143-6. 2003.
- Tjolsen, A., O. G. Berge, S. Hunskar, J. H. Rosland e K. Hole. The formalin test: an evaluation of the method. Pain, v.51, n.1, Oct, p.5-17. 1992.

- Tjølsen, A. e K. Hole. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J. (Eds.), *The Pharmacology of Pain*. Springer Verlag, Berlin, v.130, p.1-20. 1997.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum e D. Julius. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, v.21, n.3, Sep, p.531-43. 1998.
- Tracey, I., A. Ploghaus, J. S. Gati, S. Clare, S. Smith, R. S. Menon e P. M. Matthews. Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. *J Neurosci*, v.22, n.7, Apr 1, p.2748-52. 2002.
- Tsuchiya, M., A. Sakakibara e M. Yamamoto. A tachykinin NK1 receptor antagonist attenuates the 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate-induced nociceptive behaviour in the rat. *Eur J Pharmacol*, v.507, n.1-3, Jan 10, p.29-34. 2005.
- Uda, R., S. Horiguchi, S. Ito, M. Hyodo e O. Hayaishi. Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D2, E2, or F2 alpha to conscious mice. *Brain Res*, v.510, n.1, Feb 26, p.26-32. 1990.
- Vallance, P. e N. Chan. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, v.85, n.3, Mar, p.342-50. 2001.
- Velazquez, K. T., H. Mohammad e S. M. Sweitzer. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res*, v.55, n.6, Jun, p.578-89. 2007.
- Vellani, V., S. Mapplebeck, A. Moriondo, J. B. Davis e P. A. Mcnaughton. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*, v.534, n.Pt 3, Aug 1, p.813-25. 2001.
- Vinegar, R., J. F. Truax e J. L. Selph. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.143, n.3, Jul, p.711-4. 1973.
- Vivier, E. e B. Malissen. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*, v.6, n.1, Jan, p.17-21. 2005.
- Voilley, N., J. De Weille, J. Mamet e M. Lazdunski. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci*, v.21, n.20, Oct 15, p.8026-33. 2001.
- Wajima, Z., X. Y. Hua e T. L. Yaksh. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res*, v.877, n.2, Sep 22, p.314-21. 2000.
- Wang, J. F., S. G. Khasar, S. C. Ahlgren e J. D. Levine. Sensitization of C-fibres by prostaglandin E2 in the rat is inhibited by guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), 2',5'-dideoxyadenosine and Walsh inhibitor peptide. *Neuroscience*, v.71, n.1, Mar, p.259-63. 1996.

- Wen, Z. H., Y. C. Chang e C. S. Wong. Implications of intrathecal pertussis toxin animal model on the cellular mechanisms of neuropathic pain syndrome. Acta Anaesthesiol Sin, v.41, n.4, Dec, p.187-96. 2003.
- Wetsel, W. C., W. A. Khan, I. Merchenthaler, H. Rivera, A. E. Halpern, H. M. Phung, A. Negro-Vilar e Y. A. Hannun. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. J Cell Biol, v.117, n.1, Apr, p.121-33. 1992.
- Yaksh, T. L., E. O. Abay, 2nd e V. L. Go. Studies on the location and release of cholecystinin and vasoactive intestinal peptide in rat and cat spinal cord. Brain Res, v.242, n.2, Jun 24, p.279-90. 1982.
- Yashpal, K., G. M. Pitcher, A. Parent, R. Quirion e T. J. Coderre. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. J Neurosci, v.15, n.5 Pt 1, May, p.3263-72. 1995.
- Yasukawa, K., T. Akihisa, H. Oinuma, Y. Kasahara, Y. Kimura, S. Yamanouchi, K. Kumaki, T. Tamura e M. Takido. Inhibitory effect of Di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. Biol Pharm Bull, v.19, n.10, Oct, p.1329-31. 1996.
- Zhang, G. e S. Ghosh. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. J Clin Invest, v.107, n.1, Jan, p.13-9. 2001.
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain, v.16, n.2, Jun, p.109-10. 1983.