

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Débora Lanzauster

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NA ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO 3,4,5-
TRIMETOXIDIHIDROCIÂNICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L297p Lanznaster, Débora
Participação dos receptores TRPV1 na atividade
Antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico em
Camundongos [dissertação] / Débora Lanznaster ; orientador,
Adair Roberto Soares Santos. - Florianópolis, SC, 2011.
71 p.: il., grafs., plantas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Camundongo como animal de laboratório
- Comportamento. 3. Nocicepção. 4. Capsaicina. I. Santos,
Adair Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.
Titulo.

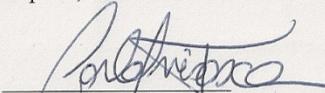
CDU 612.82

DÉBORA LANZMASTER

**“PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO 3,4,5-
TRIMETOXIDIHIDROCINÂMICO EM
CAMUNDONGOS”**

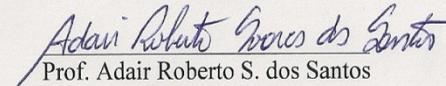
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 20 de maio de 2011.

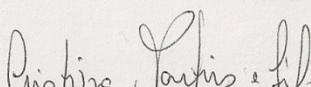


Prof.a. Carla Inês Tasca
Coordenadora do Curso

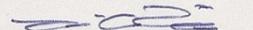
Banca Examinadora:



Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC



Prof.a. Cristina Martins e Silva Prof. Daniel Zoccal
Membro da Banca Externo Membro-UFSC



Prof.a. Tânia Silvia Fröde
Membro - UFSC

*Dedico esse trabalho à minha avó,
Maria Edit Bruns (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional;

Ao orientador prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela oportunidade e recursos materiais e financeiros;

Ao prof. Dr. Valdir Alves Facundo, pelo fornecimento do composto estudado;

Aos atuais e ex-membros da “família LANDI”, pelo ótimo convívio;

Aos professores da Pós-graduação em Neurociências, pelos valiosos ensinamentos; ao secretário Nivaldo, sempre prestativo;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial à dona Vilma e seu Carlos;

À CAPES/REUNI, pelo auxílio financeiro.

*“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e
nela só tenho uma chance de fazer o que quero.
Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce,
dificuldades para fazê-la forte,
tristeza para fazê-la humana e
esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas,
elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.”*

Clarice Lispector

RESUMO

A procura por novas moléculas com atividade analgésica significativa, principalmente oriundas de plantas, continua sendo alvo da pesquisa acadêmica e da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes no tratamento da dor. Assim, muitas pesquisas recentes têm focado essa ação em moléculas com capacidade de modular a atividade do receptor TRPV1, que desempenha papel importante na codificação e transmissão do estímulo doloroso. O TMDC, extraído dos frutos de *P. tuberculatum*, demonstrou efeito antinociceptivo significativo na nocicepção induzida pela formalina (fase neurogênica) e capsaicina, sugerindo uma modulação negativa dos receptores TRPV1. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a participação dos receptores TRPV1 no efeito antinociceptivo do TMDC, bem como das vias de sinalização que levam à sensibilização desse receptor, através de modelos animais de dor. O TMDC inibe a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de capsaicina após 30 min da sua administração, e esse efeito perdura até 2 h. Além disso, quando administrado em conjunto com a capsaicina, pela via i.pl., o TMDC também é capaz de inibir o comportamento nociceptivo observado nesse modelo. O tratamento dos animais com TMDC pela via i.t., 15 min antes, também inibe a nocicepção induzida pela capsaicina, da mesma forma que, quando administrado via i.p., inibe a nocicepção induzida pela administração i.t. de capsaicina. Contudo, quando administrado pela v.o., o TMDC tem seu efeito antinociceptivo diminuído no modelo da capsaicina. A administração i.p. do TMDC também inibe a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de BK, porém não inibe o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de PGE2, PMA e FSK. Da mesma forma, o TMDC, administrado via i.p., inibe a nocicepção induzida pela administração i.t. de SP. O pré-tratamento dos animais com naloxona (antagonista de receptores opióides) reverte o efeito antinociceptivo do TMDC no modelo da capsaicina i.pl. O TMDC é capaz de aumentar a latência dos animais submetidos ao teste da placa quente, sugerindo uma atividade analgésica intrínseca do composto. Além disso, o TMDC não altera a temperatura corporal dos animais tratados (via i.p.). Os dados apresentados nesse estudo nos sugerem que o TMDC possui efeito antinociceptivo significativo, em parte por ser capaz de modular a atividade dos receptores TRPV1 centrais e periféricos, podendo

representar uma molécula com grande potencial para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes no tratamento de patologias acompanhadas de dor.

Palavras-chave: TMDC, *P. tuberculatum*, efeito antinociceptivo, TRPV1

ABSTRACT

The research for new molecules with significant analgesic properties, particularly from plants, remains the main target of academic research and the pharmaceutical industry aiming to develop novel and improved drugs more effective for pain treatment. Recent studies have focused on molecules with the ability to modulate the TRPV1 receptor activity, which plays an important role in the encoding and transmission of painful stimuli. TMDC, extracted from *P. tuberculatum* fruits, showed significant antinociceptive effect against formalin- (neurogenic phase) and capsaicin- induced nociception, suggesting a negative modulation of TRPV1 receptors activity. Thus, the goal of this study was to investigate the involvement of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of TMDC as well as the signaling pathways that lead to sensitization of this receptor, through animal models of pain. TMDC inhibits spontaneous nociception induced by i.pl. injection of capsaicin after 30 min of its administration, and this effect lasts up for 2 h. Furthermore, when administered in combination with capsaicin, via i.pl., TMDC is also able to inhibit this nociceptive behavior. Animals treated with TMDC (i.t.), 15 min before, also inhibits nociception induced by capsaicin i.pl., in the same way that, when administered i.p., TMDC inhibits nociception induced by i.t. administration of capsaicin. However, when administered by p.o., the TMDC antinociceptive effect in capsaicin i.pl. model is diminished. The i.p. administration of TMDC also inhibits spontaneous nociception induced by BK i.pl., but does not inhibit the nociceptive behavior induced by i.pl. injection of PGE2, PMA and FSK. Likewise, the TMDC, administered i.p., inhibits the nociception induced by i.t. SP administration. Pretreatment with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist) reversed the antinociceptive effect of TMDC on capsaicin i.pl. model. TMDC increases the latency of mice in the hot plate test, suggesting an intrinsic analgesic activity of this compound. Moreover, TMDC was not able to increase the body temperature of treated animals (via i.p.). The data presented in this study suggest that TMDC has a significant antinociceptive effect, in part for being able to modulate the activity of central and peripheral TRPV1 receptors, and may represent an interesting molecule for the development of more efficient drugs for treating diseases accompanied by pain.

Key-words: TMDC, *P. tuberculatum*, antinociceptive effect, TRPV1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC. Fonte: adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.	22
Figura 2 – Via ascendente da nocicepção. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A δ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula espinal, onde neurônios de segunda ordem repassam a informação para os tratos neuronais ascendentes. Fonte: adaptado de LONGHI-BALBINOT, 2010..	23
Figura 3 – Via descendente da nocicepção e principais áreas envolvidas no controle descende da dor. PAG: substância cinzenta periaquedutal; NRM: núcleo magno da rafe; DRG: gânglio da raiz dorsal. Fonte: adaptado de KANDEL, 2000.	24
Figura 4 – Via nociceptiva ativada pelos receptores de bradicinina (B ₂) e prostaglandina (EP), que integram a participação das proteínas quinase C e A com conseqüente sensibilização do receptor TRPV1. Adaptado de WANG et al., 2006.	26
Figura 5 – Frutos e folhas de <i>P. tuberculatum</i> , em seu ambiente natural (Cortesia Dra. Rosely Valéria Rodrigues)..	30
Figura 6 – Ramo de <i>P. tuberculatum</i> com folhas e frutos (RODRIGUES, 2009)..	30
Figura 7 – Estrutura molecular do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), extraído dos frutos de <i>P. tuberculatum</i>	38
Figura 8 – Efeito do TMDC administrado pela via intraplantar (A), intratecal (B), ou oral (C) na nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de capsaicina (1,6 μ g/pata) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC pela via i.pl. em associação com a capsaicina, via i.t. 15 min antes, e via oral 1h antes do teste, sendo colocados nas câmaras individuais de observação por pelo menos 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de: 5-6 animais (tratamento i.pl.), 6-8 animais (tratamento i.t.) ou 4-6 animais (tratamento v.o.), e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): * P < 0,05; ** P < 0,01 e *** P < 0,001 comparados ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pelas mesmas vias que o TMDC).....	43
Figura 9 – Curso temporal do efeito antinociceptivo do TMDC, administrado pela via i.p., na nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μ g/pata) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC e 0; 0,5; 1; 2 e 4 h após os animais foram submetidos ao modelo de nocicepção. Antes da realização do experimento, os camundongos foram colocados nas câmaras individuais de observação por pelo menos 30 min. Cada ponto da curva representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de Newman Keuls): * P < 0,05 comparados ao	

grupo controle (pontos pretos; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).....44

Figura 10 – Efeito do TMDC administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intratecal de capsaicina (0,2 nmol/sítio) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).....45

Figura 11 – Efeito do TMDC (10 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de ácido acético 2% pH 4 (20 μ l) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC ou solução veículo (5% Tween 80 em solução salina) e colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Análise estatística realizada através do teste Mann-Whitney.46

Figura 12 – Efeito do TMDC (10 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de bradicinina (BK, 10 nmol/pata), prostaglandina E2 (PGE2, 0,3 nmol/pata), miristato-acetato de forbol (PMA, 50 pmol/pata) ou forskolina (FSK, 10 nmol/pata) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (teste Mann-Whitney): * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).47

Figura 13 – Efeito do TMDC (1 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intratecal de substância P (0,1 nmol/sítio) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (teste Mann-Whitney): ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).....48

Figura 14 – Efeito do tratamento prévio dos camundongos com salina (10 ml/kg, i.p.; grupos controles) ou naloxona (1 mg/kg, i.p.; antagonista não seletivo de receptores opioides) sobre o efeito antinociceptivo do TMDC (1 mg/kg, i.p.) e da morfina (1 mg/kg, s.c.; agonista não seletivo de receptores opioides, utilizada como controle positivo) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μ g/pata). Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Bonferroni): * $P < 0,05$ comparados ao grupo pré-tratado com

salina e solução veículo (5% Tween 80 em solução salina); ^{##} $P < 0,01$ comparado ao grupo pré-tratado com salina e morfina; ^{\$\$} $P < 0,01$ comparado ao grupo pré-tratado com salina e TMDC.49

Figura 15 – Efeito do TMDC administrado pela via i.p. na latência dos animais expostos à placa quente ($55 \pm 1^\circ\text{C}$). A latência basal foi avaliada antes dos tratamentos com TMDC ou solução veículo (Basal; colunas brancas), e 30 min após os animais foram novamente expostos à placa quente (Pós-tratamento; colunas hachuradas). Cada coluna representa a média de 4 a 5 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): ^{**} $P < 0,01$ comparado ao grupo veículo (animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.), ^{##} $P < 0,01$ diferença entre os grupos basal e pós-tratamento com TMDC 10 mg/kg.50

Figura 16 – Efeito do TMDC, administrado pela via i.p., na temperatura corporal dos animais ao longo do tempo. A temperatura basal (B) foi avaliada antes dos tratamentos com TMDC ou solução veículo (colunas brancas), e 0,5; 1; 2 e 4 h após a temperatura corporal dos animais foi novamente avaliada. Cada coluna representa a média de 4 a 5 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Análise estatística realizada através de ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida do teste de Newman Keuls.51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ASICs	Canais Iônicos Sensíveis a Ácido
ATP	Trifosfato de Adenosina
B1R	Receptor 1 de Bradicینina
B2R	Receptor 2 de Bradicینina
BHE	Barreira hemato-encefálica
BK	Bradicینina
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
COX	Ciclo-oxigenase
DI₅₀	Dose que inibe a resposta em 50%
E.P.M	Erro Padrão da Média
FSK	Forskolina
INPA	Instituto de Pesquisa da Amazônia
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
i.t.	intratecal
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NK-1	Receptor de Neurocininas tipo 1
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PKCα	Proteína Quinase C subtipo α
PMA	Miristato-Acetato de Forbol
s.c.	subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TMDC	Ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório relacionado à proteína Anquirina 1
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório Melastatina 8
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	DOR / NOCICEÇÃO.....	21
1.2	PRODUTOS NATURAIS.....	27
1.3	FAMÍLIA PIPERACEAE E A ESPÉCIE <i>PIPER TUBERCULATUM</i>	28
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAL BOTÂNICO – IDENTIFICAÇÃO, PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DO TMDC	37
4.2	ANIMAIS	38
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	38
4.3.1	Nociceção induzida pela ativação de receptores TRPV1 periféricos.....	38
4.3.2	Nociceção induzida pela ativação de receptores TRPV1 medulares.....	39
4.3.3	Nociceção induzida por solução ácida – ácido acético 2% pH 4.....	40
4.3.4	Nociceção induzida por bradicinina, prostaglandina E2, miristato-acetato de forbol e forskolina	40
4.3.5	Nociceção induzida por substância P.....	40
4.3.6	Envolvimento do sistema opioide	41
4.3.7	Placa quente	41
4.4	TEMPERATURA CORPORAL	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4.6	DROGAS E REAGENTES	42
5	RESULTADOS	43
5.1	NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS	43
5.2	NOCICEÇÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES TRPV1 MEDULARES	44
5.3	NOCICEÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 2% PH 4	45

5.4	NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR BRADICININA, PROSTAGLANDINA E2, MIRISTATO-ACETATO DE FORBOL E FORSKOLINA	46
5.5	NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA P.....	47
5.6	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIOIDE	48
5.7	PLACA QUENTE	49
5.8	TEMPERATURA CORPORAL.....	50
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR / NOCICEPÇÃO

O sucesso reprodutivo dos animais depende, em parte, de detectar e evitar ameaças à sua integridade que poderiam prejudicar ou mesmo impedir sua habilidade de se reproduzir. Assim, animais com mecanismos adaptativos capazes de reconhecer estímulos nocivos e desencadear respostas fisiológicas e comportamentais adequadas de proteção poderão se reproduzir mais e garantir a sobrevivência da espécie. Um exemplo de mecanismo adaptativo com caráter protetor é a dor. Estudos genéticos e moleculares demonstram que os mecanismos sensoriais responsáveis pela decodificação da sensação dolorosa surgiram há muito tempo na escala evolutiva dos animais, sendo também encontrados em lampreias, vermes, insetos e peixes (WALTERS, 2009).

Em 1986, a dor foi conceituada pela IASP (sigla em inglês para “Associação Internacional para o Estudo da Dor”) como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a lesões reais ou potenciais, ou descrita em termos de tais lesões”. O componente sensorial da dor consiste na captação e processamento dos estímulos nocivos, enquanto o emocional envolve o processamento cognitivo do evento, sendo moldado pela experiência, contexto e estado interno do indivíduo. Porém, o componente emocional é pouco estudado em animais de experimentação, sendo avaliado apenas o caráter sensorial da dor, denominado nocicepção (JULIUS; BASBAUM, 2001; LOESER; TREEDE, 2008).

A nocicepção consiste na recepção e decodificação do estímulo nocivo por estruturas altamente especializadas do sistema nervoso – os nociceptores. Tais nociceptores consistem em terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias com características distintas (por exemplo, limiares de ativação e sensibilidade) em relação a outras estruturas nervosas sensoriais. As fibras C e A δ , de menor calibre, estão relacionadas à transdução e condução do estímulo nocivo; enquanto as fibras C não são mielinizadas, as fibras A δ são pouco mielinizadas, possuindo maior velocidade de condução do impulso nervoso que as primeiras. Já as fibras A β são mielinizadas e de alto calibre, responsáveis por detectar estímulos inócuos aplicados na pele, músculos e articulações, e em condições fisiológicas não são

relacionadas à transmissão dolorosa (JULIUS; BASBAUM, 2001). Algumas características inerentes a cada fibra estão representadas na Figura 1.

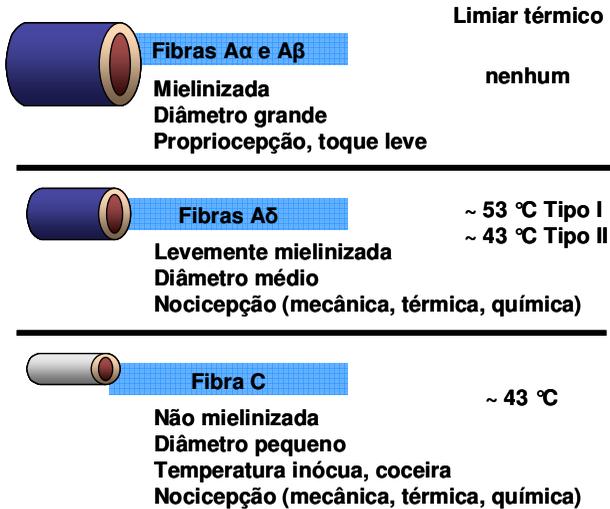


Figura 1. Tipos de fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal da periferia ao Sistema Nervoso Central. Fonte: adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

As fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem nas camadas superficiais da medula espinal. Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, cruzam a medula espinal até o lado contralateral e ascendem a múltiplas áreas supra-espinais por meio de tratos neuronais específicos (Figura 2), como por exemplo, o trato espinotalâmico. Assim, os neurônios de segunda ordem ativarão no tálamo neurônios de terceira ordem levando a informação nociceptiva até as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção da dor (VANDERAH, 2007).

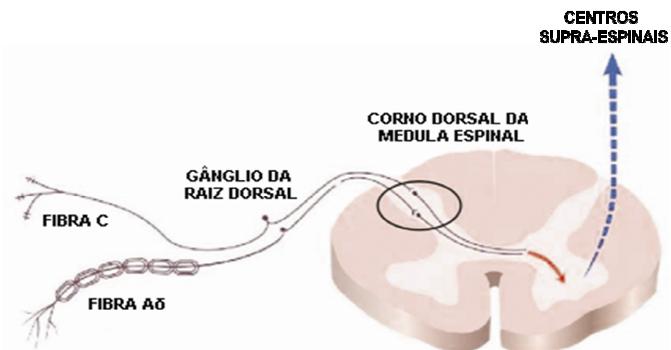


Figura 2. Via ascendente da nociceção. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A δ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula espinal, onde neurônios de segunda ordem repassam a informação para os tratos neurais ascendentes. Fonte: adaptado de LONGHI-BALBINOT, 2010.

O organismo ainda possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor. O principal deles, a via descendente inibitória (Figura 3), envolve uma série de estruturas encefálicas, como o córtex cerebral, hipotálamo, amígdala, locus coeruleus, substância cinzenta periaquedual, entre outros, além de sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos destacar o sistema opioide (MILLAN, 2002).

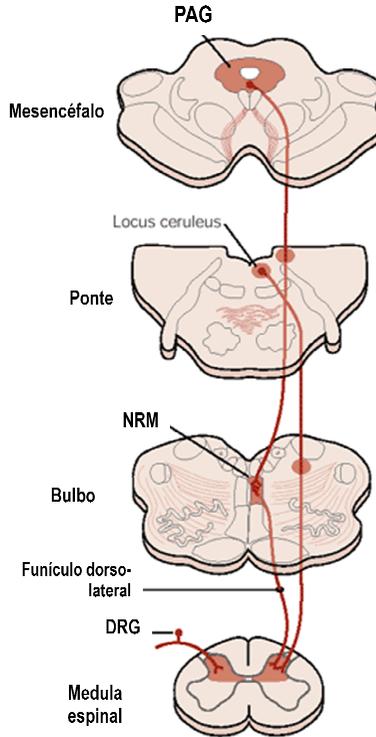


Figura 3. Via descendente da nocicepção e principais áreas envolvidas no controle desce da dor. PAG: substância cinzenta periaquedutal; NRM: núcleo magno da rafe; DRG: gânglio da raiz dorsal. Fonte: adaptado de KANDEL, 2000.

Na natureza, as lesões teciduais podem ser causadas por forças mecânicas e agentes químicos, bem como mudanças excessivas de temperatura; assim, espera-se que os nociceptores sejam capazes de detectar estímulos nocivos de diversas origens. De fato, foi demonstrado que os nociceptores apresentam mecanismos de transdução para essas diferentes modalidades de estímulos, e, por isso, são denominados polimodais (COSTIGAN; WOOLF, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). Entretanto, em casos de hipersensibilidade, a dor pode ser provocada por estímulos normalmente inócuos, onde recebe o nome de alodínia, ou ainda ser exagerada e prolongada frente um estímulo nocivo – por isso denominada hipernocicepção (ou hiperalgesia) (LOESER; TREEDE, 2008). Estas hipersensibilidades dolorosas surgem como resultado da

sensibilização central e/ou periférica, provocadas por um estímulo nocivo persistente ou uma resposta inflamatória que induz à plasticidade no sistema nervoso. A sensibilização é caracterizada pela atividade espontânea dos neurônios, aumento da resposta a estímulos supra-liminares e diminuição do limiar de ativação dos nociceptores (FERREIRA et al., 2005), eventos induzidos pelo aumento no número de espinhas dendríticas, brotamento de novos botões sinápticos e aumento na expressão de alguns receptores presentes nos nociceptores, entre outros (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Além disso, esse processo de sensibilização leva à ativação de nociceptores silenciosos (nociceptores que se mantêm não responsivos em situações fisiológicas ou dolorosas; WOOLF, 1989) e também ao recrutamento de fibras A β , anteriormente não relacionadas à sinalização nociceptiva (BARON; MAIER, 1995).

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo térmico nocivo), distensão do tecido (estímulo mecânico nocivo) ou diferença osmótica, resulta na liberação local de mediadores químicos tais como a bradicinina, prótons, metabólitos do ácido aracdônico, ATP, citocinas, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, opioides e acetilcolina, entre outros (JULIUS; BASBAUM, 2001; ROCHA et al., 2007). Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando à propagação do sinal nociceptivo por meio do aumento da permeabilidade da membrana plasmática neuronal a cátions e consequente geração do potencial de ação (RAJA et al., 1999; COSTIGAN; WOOLF, 2000).

Os receptores TRP (sigla em inglês para *transient receptor potencial*) constituem uma família de canais catiônicos (permeáveis principalmente ao cálcio) responsáveis pela detecção do estímulo nocivo, uma vez que sua ativação gera o potencial de ação necessário para transmissão da informação nociceptiva (TOMINAGA, 2007). Além disso, estes receptores possuem a capacidade de detectar mudanças de temperatura, particularmente temperaturas nocivas (abaixo de 17 °C ou acima de 43 °C), sendo a maioria ativada também por produtos naturais, como capsaicina, mentol e cinamaldeído, entre outros (CORTRIGHT et al., 2007). Entre os receptores de potencial transitório (TRPs) envolvidos na sinalização nociceptiva, o TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) desempenha papel principal, contribuindo tanto na integração como na detecção de estímulos químicos e térmicos (CATERINA et al., 2000). Além disso, estudos demonstram que certas lesões neuropáticas e doenças inflamatórias induzem a um aumento na expressão de receptores TRPV1 na medula espinal, fato que colabora

para a sensibilização dos neurônios aferentes primários, contribuindo com casos de hipernocicepção e alodínia (HUDSON et al., 2001; LUO et al., 2004).

O TRPV1 é expresso nos terminais centrais e periféricos de fibras sensoriais do tipo C e A δ , e pode ser ativado por diferentes estímulos além do calor nocivo, incluindo prótons, alguns mediadores endógenos lipídicos (leucotrienos e anandamida) e compostos pungentes como a capsaicina, o princípio ativo da pimenta vermelha (CATERINA et al., 1997; HWANG et al., 2000). Além dos seus ligantes naturais, o TRPV1 pode ser modulado alostericamente por mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina, ATP e fatores de crescimento, direta ou indiretamente, por meio da ativação de vias intracelulares de sinalização constituídas por proteínas quinases (Figura 4) (BANDELL et al., 2004; WANG et al., 2008). Essas proteínas fosforilam o canal, diminuindo seu limiar de ativação e aumentando sua probabilidade de ser ativado pelo calor, prótons ou pela capsaicina (PREMKUMAR; AHERN, 2000). Assim, o receptor TRPV1 funciona como um integrador molecular onde cada estímulo sensibiliza o canal a outro estímulo, resultando na amplificação da função neuronal sensória (CRANDALL et al., 2002)

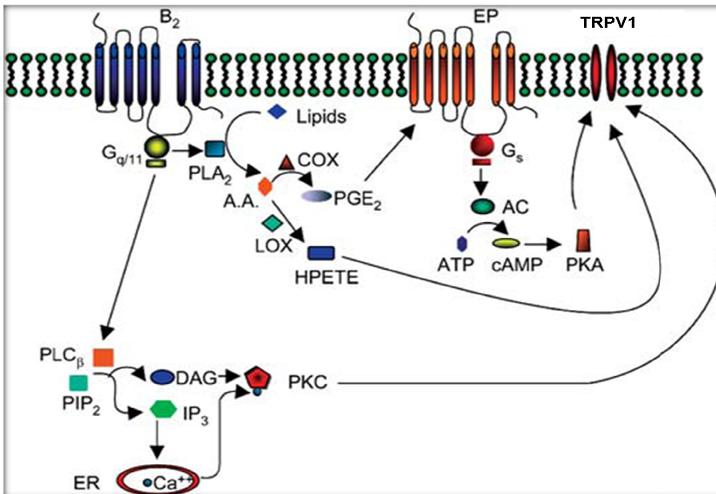


Figura 4. Via nociceptiva ativada pelos receptores de bradicinina (B2) e prostaglandina (EP), que integram a participação das proteínas quinase C e A com consequente sensibilização do receptor TRPV1. Adaptado de WANG et al., 2006.

Outra via que leva à sensibilização do receptor TRPV1 e consequente geração de estados hiperalgésicos é a via de interação com receptores NK-1 para a substância P. O neuropeptídeo substância P (SP) foi o primeiro “neurotransmissor” descrito para a transmissão da nocicepção, e está principalmente relacionado com a experiência de dor moderada a intensa (WOOLF et al., 1998). Marcações imunohistoquímicas demonstram que a co-localização de receptores TRPV1 e NK-1 no gânglio da raiz dorsal leva a um *cross talk* entre esses dois receptores via PKC, o que sensibiliza o receptor TRPV1 e aumenta sua atividade (ZHANG et al., 2007).

O receptor TRPV1 tem sido considerado um alvo terapêutico importante no tratamento da dor, uma vez que (i) seus agonistas, como a capsaicina, causam dessensibilização dos receptores, provocando um alívio da dor em estudos pré-clínicos, e (ii) seus antagonistas reduzem os comportamentos relacionados à dor em modelos animais de inflamação, osteoartrite, câncer e dor pós-operatória (GUNTHORPE; CHIZH, 2009; PAL et al., 2009; WONG; GAWA, 2009). Além disso, muitos agonistas e antagonistas de receptores TRPV1 já estão sob investigação em estudos clínicos. Um exemplo é o composto 4975 (AdleaTM), derivado da capsaicina, que reduziu a dor em pacientes com artroplastia total do joelho, em pacientes com osteoartrite e outras condições dolorosas clínicas, após uma única injeção (para revisão ver KNOTKOVA et al., 2008; REMADEVI; SZALLISI, 2008). Assim, compostos com a capacidade de modular a atividade do receptor TRPV1 constituem alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos com utilidade terapêutica.

1.2 PRODUTOS NATURAIS

Há muito tempo, o homem busca na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida e aumentar suas chances de sobrevivência. O uso das plantas como alimento sempre existiu, e a este costume se incorporou a busca de matéria prima para confecção de roupas e ferramentas. Plantas com propriedades alucinógenas logo foram incorporadas aos rituais religiosos, e a elas foram atribuídas propriedades mágicas de colocar os homens em contato com os deuses (LORENZI; MATOS, 2002). O ópio, extraído da papoula (*Papaver somniferum*), era comumente utilizado pelos sacerdotes sumerianos em seus rituais e para aliviar a dor em doentes agonizantes (BROWNSTEIN, 1993). Deste modo, o conhecimento sobre a

propriedade medicinal da flora foi passado ao longo de gerações, que em conjunto com os mitos e rituais, formavam parte importante das culturas locais.

Os produtos naturais (ou metabólitos secundários) podem ser considerados estruturas privilegiadas para a descoberta de novos fármacos, afirmação amparada pelo fato que os produtos naturais devem combinar-se a algumas proteínas para serem biossintetizados e exercer sua função inerente no organismo em que foram produzidos (LI; VEDERAS, 2009). Assim, muitas dessas moléculas podem ser estruturalmente favorecidas a se ligar em enzimas ou proteínas receptoras em outros organismos, sendo capazes de desencadear outras respostas fisiológicas.

Há 220 anos, o farmacêutico Friedrich Setürner isolou o primeiro composto ativo de uma planta: a morfina, extraída do ópio produzido pela *P. somniferum*. Isso iniciou uma era na qual medicamentos podiam ser isolados e purificados de plantas, estudados e administrados em dosagens precisas que não variavam conforme a fonte ou a idade do material. Em 1990, cerca de 80% dos fármacos eram originados de fontes naturais ou de análogos inspirados por elas (LI; VEDERAS, 2009). Atualmente, em algumas áreas da medicina, como no tratamento do câncer, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento ainda são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas (CALIXTO, 2000).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal no mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas – aproximadamente 20% da diversidade biológica do planeta – fornecendo um potencial imenso para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2000). As duas principais vias de identificação de produtos naturais são (i) o conhecimento das práticas tradicionais (ou etnofarmacologia), e (ii) a triagem aleatória de plantas, sendo a primeira mais vantajosa por permitir o planejamento da pesquisa de novos fármacos a partir do conhecimento empírico já existente (YUNES; CALIXTO, 2001).

1.3 FAMÍLIA PIPERACEAE E A ESPÉCIE *PIPER TUBERCULATUM*

A família Piperaceae, classificada entre as mais primitivas famílias de angiospermas, é constituída de 10 a 12 gêneros e um grande e incerto número de espécies, estimado entre 1400 e 2000, que habitam

lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais (CRONQUIST, 1981; JOLY, 1991). As plantas pertencentes a esta família possuem importância econômica, ecológica e medicinal, sendo que muitas espécies são utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias do trato respiratório (asma, bronquite e tosse) e do aparelho digestivo (dores abdominais e diarreias), bem como para fins antiinflamatórios (contra o reumatismo), antimicrobianos (com finalidade antibacteriana, antifúngica e no tratamento de feridas), antileucêmicos, anti-helmínticos e no tratamento de doenças venéreas (LEAL, 2000). Em virtude destas inúmeras indicações terapêuticas, as Piperaceae constituem uma estimulante fonte para a pesquisa fitoquímica e farmacológica (MOREIRA et al., 1995; BENEVIDES et al., 1999).

O gênero *Piper* tem mais de 1000 espécies que se distribuem geograficamente pelas regiões subtropicais (DYER et al., 2004), tropicais e temperadas dos dois hemisférios (GUIMARÃES; GIORDIANO, 2004). Este gênero apresenta uma das maiores diversidades de táxons nos países neotropicais, em que corresponde a cerca de 2/3 de todas as espécies neles descritas. Muitas plantas deste gênero crescem em florestas quentes, úmidas e com alto índice pluviométrico. No Brasil, ocorrem cerca de 270 espécies do gênero *Piper* (GUIMARÃES; GIORDIANO, 2004).

A espécie *P. tuberculatum* apresenta-se como arbustos com 2 - 2,5 m de altura, e ramos pubérulos (Figura 5). As folhas possuem bainha alada, lâmina oblongo-elíptica ou ovado-elíptica, base assimétrica e ápice agudo, de textura papiráceomembranácea, brilhante; nervuras ascendentes em número de 8-10 pares, penínervas, dispostas até o ápice da lâmina (Figura 6). As espigas são eretas, com 4-7 cm comprimento; bractéolas triangular-subpeltadas, marginalmente franjadas e a drupa é tetragonal, ovada ou subobovada, lateralmente comprimida (GUIMARÃES; GIORDIANO, 2004).



Figura 5. Frutos e folhas de *P. tuberculatum*, em seu ambiente natural (Cortesia Dra. Rosely Valéria Rodrigues).

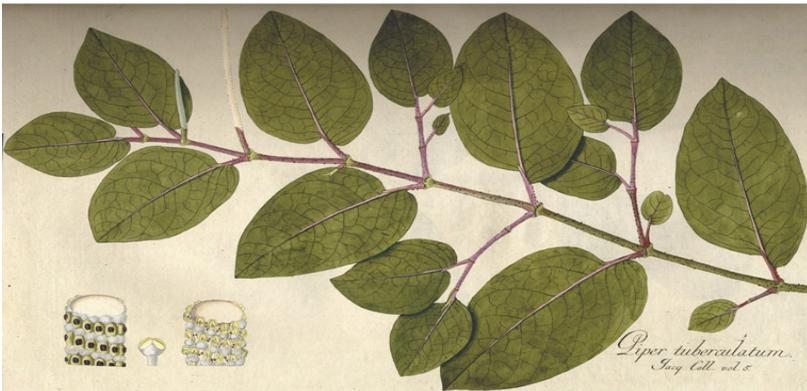


Figura 6. Ramo de *P. tuberculatum* com folhas e frutos (RODRIGUES, 2009).

Sua distribuição geográfica estende-se desde o Continente Americano e Antilhas. No Brasil, é encontrada nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Cresce em altitudes aproximadas aos 550 m, em encosta úmida, em capoeira e em locais brejosos.

A *P. tuberculatum* é conhecida popularmente como pimenta-macaco, Jaborandi-falso ou ainda como jamburana (GUIMARÃES;

GIORDIANO, 2004). É uma planta medicinal utilizada popularmente como estimulante, no tratamento de acidentes ofídicos, dor de dente (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 1999) e como estimulante para problemas estomacais (CHAVES et al., 2003). CÍCERO BEZERRA FELIPE et al. (2007) demonstraram que a piplartina, um alcalóide extraído dos frutos de *P. tuberculatum*, possui efeito sedativo e antidepressivo em camundongos. Estudos feitos por BEZERRA et al. (2007, 2008) demonstraram que este composto tem a capacidade de inibir a proliferação de células leucêmicas, enquanto que a propriedade antitumoral dos alcalóides de *P. tuberculatum* foi demonstrada quanto à sua atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (TSAI et al., 2005). Além disso, a atividade antitumoral da piplartina está relacionada à inibição da taxa de proliferação tumoral, observada pela redução da reação imuno-histoquímica com Ki67, um anticorpo monoclonal que identifica um antígeno nuclear associado às fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, em tumores de animais tratados (BEZERRA et al., 2006).

RODRIGUES et al. (2009) reportaram o efeito antinociceptivo do extrato bruto, frações e três compostos isolados a partir dos frutos de *P. tuberculatum* sobre a nocicepção visceral induzida por ácido acético. Neste estudo, demonstrou-se que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), o composto mais potente entre os outros compostos isolados dessa planta testados no trabalho, foi 7.700 vezes mais potente que o ácido acetil salicílico (aspirina), um anti-inflamatório não esteroideal utilizado na clínica para o tratamento da dor. O modelo de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético na cavidade peritoneal é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes – naturais ou sintéticos – com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (COLLIER et al., 1968; TJØLSEN; HOLE, 1997). Por induzir a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina, interleucinas e substância P (COLLIER et al., 1968; VINEGER et al., 1979; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001), o ácido acético provoca a ativação dos nociceptores e fibras aferentes, aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cérebro-espinhal (FENG et al., 2003; ZHU et al., 2004). Em função disto, este modelo apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade, sendo que agentes anti-inflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos mostram-se efetivos em reduzir a dor associada a este modelo de nocicepção (FENG et al., 2003).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o TMDC possui atividade antinociceptiva em outros modelos animais de nocicepção utilizados na avaliação de novas moléculas com potencial analgésico, como os testes de formalina (fase neurogênica) e glutamato. Além disso, o tratamento de camundongos com diferentes doses de TMDC (via intraperitoneal) reduziu de forma dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, com inibição de $63\pm 6\%$ e DI_{50} de 0,29 (0,17-0,49) mg/kg. Porém, o tratamento com TMDC não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo induzido por agonistas de outros receptores TRPs (a saber, TRPA1 e TRPM8), sugerindo que o efeito do TMDC se deva a uma possível interação com as vias de ativação dos receptores TRPV1. O mesmo tratamento com TMDC não alterou o comportamento dos camundongos nos modelos da barra giratória e campo aberto, demonstrando que este composto não possui efeitos indesejados significativos, como sedação e relaxamento muscular, que poderiam estar associados a uma redução inespecífica da resposta nociceptiva observada nos modelos experimentais utilizados.

2 JUSTIFICATIVA

A dor é um dos principais motivos de procura por atendimento médico, e a grande maioria dos analgésicos disponíveis no mercado, baseados em anti-inflamatórios não esteroidais e opioides “fracos” (e suas combinações), provê uma fonte acessível apenas para o alívio da dor fraca a moderada, enquanto muitos pacientes acometidos de dores crônicas continuam sem um tratamento eficaz (MOORE et al., 2005; BJORDAL et al., 2007). Recentemente, identificou-se um aumento de 66% nos testes clínicos (randomizados e controlados por placebo) realizados em populações de pacientes com dor crônica neuropática nos últimos cinco anos, e concluiu-se que apenas um alívio limitado havia sido alcançado com o tratamento condicional, enquanto uma grande proporção dos pacientes permaneceu sem a remissão da dor (FINNERUP et al., 2010). Além disso, a maioria dos tratamentos disponíveis causam um enorme número de efeitos colaterais indesejados, além de afetar negativamente o bem-estar dos pacientes, resultando na descontinuidade do tratamento.

Assim, novos analgésicos, baseados nos mecanismos moleculares relacionados às condições dolorosas, são necessários para um tratamento melhor e mais eficaz dos pacientes com dor. A descoberta e o desenvolvimento desses medicamentos dependem de um maior entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela geração dos quadros dolorosos e um aumento significativo no investimento em pesquisa e desenvolvimento, para que esse conhecimento se traduza em analgésicos novos, seguros e eficazes.

Há um crescente interesse científico e industrial nos últimos anos em entender a função dos receptores TRPV1 na transdução e transmissão da dor, dando enfoque significativo na identificação de moléculas com a propriedade de inativá-los (BURGESS; WILLIAMS, 2010). Além disso, muitos produtos naturais estão sendo identificados com a capacidade de modular esse receptor, como capsaicina, resiniferatoxina, scutigeral, isovelleral e, mais recentemente, eriodictiol (MC CURDY; SCULLY, 2005; ROSSATO et al., 2011)

O mercado mundial de produtos farmacêuticos opera com um volume de negócios do qual 20 milhões de dólares tem origem em substâncias vegetais bioativas. No Brasil, estima-se que 25% dos R\$ 8 milhões faturados em 1996 pela indústria farmacêutica vieram de medicamentos derivados de plantas (SOARES et al., 2005). Apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram investigadas na busca de

compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas quanto às propriedades medicinais. Nos últimos anos, ocorreu um expressivo progresso científico relacionado a estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando à identificação de novos compostos com propriedades terapêuticas (SOARES et al., 2005), campo onde a pesquisa acadêmica continua tendo um papel de destaque.

Como mencionado anteriormente, o TMDC possui um efeito antinociceptivo significativo, sendo mais eficaz que a aspirina no modelo experimental analisado (RODRIGUES et al., 2009), além de possuir efeito em outros modelos de nocicepção que envolvem a ativação de receptores TRPV1 (fase neurogênica da nocicepção induzida por formalina e nocicepção induzida por capsaicina). Diante da necessidade da descoberta de novas moléculas com propriedades modulatórias sobre esse receptor e desprovidas de efeitos colaterais significativos, o presente projeto justifica-se ao buscar ampliar o conhecimento sobre a ação antinociceptiva do TMDC, principalmente no que diz respeito ao efeito negativo desse composto sobre a atividade dos receptores TRPV1, podendo representar uma molécula promissora para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes no tratamento da dor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a atividade antinociceptiva do TMDC demonstrada em estudos anteriores e os dados existentes na literatura, o objetivo deste projeto é estender o conhecimento até agora obtido sobre o efeito antinociceptivo do TMDC sobre a ativação de receptores TRPV1 periféricos e centrais, bem como analisar seu efeito nas vias de sensibilização deste receptor, através de modelos nociceptivos em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo do TMDC na nocicepção espontânea induzida pela capsaicina i.pl., quando administrado por via oral, intraplantar e intratecal, bem como avaliar o decurso temporal do TMDC administrado via i.p. no mesmo modelo;
- Investigar a participação de receptores TRPV1 centrais no efeito antinociceptivo do TMDC, administrado via i.p.;
- Verificar o efeito do TMDC sobre a nocicepção espontânea induzida por solução ácida (ácido acético 2% pH 4);
- Analisar o efeito do TMDC na via de sinalização (receptores de bradicinina e prostaglandina E2, e proteínas quinase A e C) que leva à sensibilização de receptores TRPV1;
- Avaliar a participação de receptores NK-1 no efeito antinociceptivo do TMDC;
- Investigar se o TMDC exerce seu efeito antinociceptivo através da interação com o sistema opioide;
- Avaliar o efeito do tratamento com TMDC na sensibilidade térmica dos animais;
- Verificar se o tratamento com TMDC é capaz de provocar alterações na temperatura corporal dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO – IDENTIFICAÇÃO, PREPARAÇÃO E ISOLAMENTO DO TMDC

Os frutos de *P. tuberculatum* foram coletados em setembro de 2005 no município de Porto Velho, Rondônia, Brasil. A identificação botânica da planta foi realizada no herbário do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde um exemplar encontra-se depositado sob o número 211724. A obtenção do extrato etanólico dos frutos de *P. tuberculatum*, assim como o isolamento, a purificação e a identificação do TMDC foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia.

Os frutos devidamente secos e triturados (1,1 kg) foram extraídos com etanol (3 L x 3) à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida e forneceu 36,0 g de resíduo de coloração marrom. Parte deste material (30,0 g) foi adsorvido em sílica gel (90,0 g) e a mistura, sob a forma de pasta, foi colocada em uma coluna cromatográfica e eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol:água 85:15, obtendo-se os eluatos (frações) com os respectivos rendimentos: 22,9% para o eluato hexânico, 21,3% para o eluato diclorometano, 22,3% do eluato acetato de etila, 30,0% no eluato metanólico e 2,4% para o eluato metanol:água. A partir da fração acetato de etila (5,13 g), aplicada em coluna de sílica gel utilizando como fase móvel hexano, hexano/clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol, em polaridade crescente, obteve-se 4,49% de um sólido branco amorfo. Após análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, espectros de massas e a comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura (FACUNDO et al., 2005), foi possível propor a estrutura do **ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico** (TMDC, Figura 7).

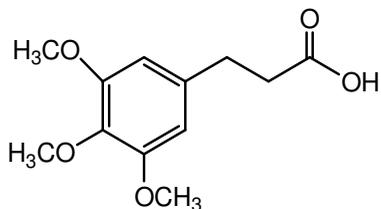


Figura 7. Estrutura molecular do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), extraído dos frutos de *P. tuberculatum*.

4.2 ANIMAIS

Este estudo utilizou camundongos Seis machos (25-35g), obtidos do Biotério Central da UFSC, aclimatados a 22 ± 2 °C em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 6 h) e tratados com água e ração à vontade. Os animais foram mantidos no laboratório por 1 h antes da realização dos experimentos para ambientação. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com animais de laboratório, e o número de animais e a intensidade do estímulo nocivo usados foram o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos (ZIMMERMANN, 1983). Os experimentos conduzidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC, sob o protocolo 23080.027310/2010-12.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.1 Nociceção induzida pela ativação de receptores TRPV1 periféricos

Para verificar a participação de receptores TRPV1 periféricos no efeito antinociceptivo do TMDC, os camundongos receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) de capsaicina (agonista TRPV1; 1,6 µg/pata; 20 µl), conforme descrito por SAKURADA et al. (1992). Antes da realização do experimento, os camundongos foram mantidos em câmaras individuais de observação (caixas de acrílico transparentes) por

30 min para ambientação. Logo após receberem a injeção de capsaicina, o comportamento nociceptivo (lamber e/ou morder a pata injetada) do animal foi observado e cumulativamente cronometrado durante 5 min. O tratamento com TMDC se deu pelas seguintes vias: via oral (v.o., 1h antes do teste; 1-10 mg/kg), via i.pl. (concomitantemente com a capsaicina; 10-100 µg/pata) ou intratecal (i.t., 15 min antes da realização do teste; 1-30 µg/sítio). Os animais do grupo controle receberam solução veículo (5% Tween 80 em solução salina 0,9% NaCl; 10 ml/kg) pelas mesmas vias que o TMDC. A injeção i.t. (5 µl) se deu conforme a metodologia descrita por HYLDEN e WILCOX (1980). Após a tricotomia da região dorsal, os animais foram contidos manualmente, e uma agulha conectada a uma microseringa Hamilton foi introduzida no espaço sub-dural entre as vértebras L5-L6. Um giro na cauda (reflexo causado pela penetração da injeção na dura máter) foi considerado como indicativo de sucesso na injeção. A injeção i.t. do TMDC não causou nenhum efeito nociceptivo *per se*.

O decurso temporal da ação antinociceptiva do TMDC, administrado via i.p., também foi avaliado no teste de nocicepção induzida pela capsaicina. Para isso, os animais foram tratados com TMDC (1 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (10 ml/kg, i.p.; grupo controle), e após 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h e 4 h receberam uma injeção i.pl. de capsaicina (1,6 µg/pata; 20 µl). O comportamento nociceptivo foi analisado conforme citado anteriormente.

4.3.2 Nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1 medulares

A fim de verificar se o TMDC seria capaz de inibir a nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1 centrais, a capsaicina foi administrada pela via i.t. (0,2 nmol/sítio, 5 µl) conforme descrito anteriormente, e o comportamento nociceptivo (lamber e/ou morder a parte do corpo posterior à injeção) foi analisado e contabilizado durante 5 min (ROSSATO et al., 2010). 30 min antes do teste, os animais foram tratados com TMDC (0,1 – 10 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.) e colocados nas câmaras individuais de observação para ambientação. Os animais do grupo controle foram tratados com solução veículo (via i.p.), utilizada para diluir o TMDC.

4.3.3 Nociceção induzida por solução ácida – ácido acético 2% pH 4

Considerando que o receptor TRPV1 também pode ser ativado por prótons (solução ácida), os animais foram tratados com TMDC (10 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (10 ml/kg, i.p.; grupo controle) e colocados nas câmaras individuais de observação. Após 30 min, receberam uma injeção i.pl. de solução ácida (ácido acético 2% pH 4; 20 µl) e o comportamento nociceptivo (lamber e/ou morder a pata injetada) foi avaliado durante 15 min, conforme descrito por MEOTTI et al. (2010).

4.3.4 Nociceção induzida por bradicinina, prostaglandina E2, miristato-acetato de forbol e forskolina

Estes protocolos de nociceção espontânea visam verificar se o TMDC exerce seu efeito modulatório sobre os receptores TRPV1 através da inibição de algum componente da via de sinalização apresentada na Figura 4. Para isso, os camundongos receberam injeções i.pl. (20 µl) de bradicinina (BK; 10 nmol/pata), prostaglandina E2 (PGE2; 3 nmol/pata), miristato-acetato de forbol (PMA, ativador da PKC; 50 nmol/pata) e forskolina (FSK, ativador da PKA; 10 nmol/pata). O comportamento nociceptivo foi observado e contabilizado durante 10 min após as injeções de BK e FSK, e durante 15 min após PGE2. Na nociceção induzida pela ativação da PKC, o comportamento foi analisado entre 15 e 45 min após a injeção de PMA. As doses e tempos utilizados nesses experimentos foram baseados nos estudos publicados por FERREIRA et al., 2005, KASSUYA et al., 2007, e NASCIMENTO et al., 2010. Os animais foram tratados com TMDC (10 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (grupo controle; 10 ml/kg, i.p.) 30 min antes da indução da nociceção, e colocados nas câmaras individuais de observação.

4.3.5 Nociceção induzida por substância P

A fim de verificar se o TMDC exerce seu efeito antinociceptivo através da interação com receptores NK-1, os camundongos receberam uma injeção i.t. (5 µl) de substância P (0,1 nmol/sítio), e o comportamento nociceptivo (lamber e/ou morder a parte posterior do corpo) foi analisado e cumulativamente contado durante 6 min (LUIZ et al., 2007). 30 min antes da realização do experimento, os animais foram

tratados com TMDC (10 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (10 ml/kg, i.p.) e colocados nas câmaras de observação individual.

4.3.6 Envolvimento do sistema opioide

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opioide na antinocicepção promovida pelo TMDC, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opioides; 1 mg/kg, i.p.). Após 20 min, os animais receberam TMDC (1 mg/kg, i.p.), morfina (1 mg/kg, s.c) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva à injeção i.pl. de capsaicina foi verificada 30 min após a administração de TMDC, morfina ou veículo. Outros grupos de animais foram pré-tratados somente com veículo e 20 min após, receberam TMDC, morfina ou veículo, 30 min antes da injeção de glutamato, utilizados como controle ao tratamento com naloxona (LUIZ et al., 2007).

4.3.7 Placa quente

Este teste foi utilizado para verificar se apenas o tratamento com TMDC é capaz de alterar a sensibilidade dos animais, de acordo com o método descrito por WOOLFE; MACDONALD (1944). Os camundongos foram expostos à placa quente (CQF/AVS – Brasil) mantida a $55 \pm 1^\circ\text{C}$, e o tempo decorrido entre a exposição e o comportamento de retirada (sacudida e/ou lambida das patas traseiras, saltos) foi cronometrado e considerado como limiar basal. O tempo de corte de 30 s foi utilizado para prevenir danos teciduais. Após a obtenção do limiar basal, os animais foram tratados com TMDC (1 e 10 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (10 ml/kg; grupo controle), e decorridos 30 min do tratamento, os animais foram novamente expostos à placa quente para obtenção do limiar pós-tratamento.

4.4 TEMPERATURA CORPORAL

Compostos capazes de modular a atividade dos receptores TRPV1 podem também provocar alterações na temperatura corporal (GAVVA et al., 2007). Para avaliar se o TMDC também possui essa característica, os animais foram tratados com TMDC (1 e 10 mg/kg, i.p.) ou solução veículo (10 ml/kg, i.p.) e 30 min após sua temperatura

corporal foi avaliada com o auxílio de um termômetro (Mallory, modelo: Thermosensor Pro) aplicado na cavidade auditiva dos animais. A temperatura corporal dos animais antes do tratamento (temperatura basal) também foi avaliada.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média (E.P.M), exceto as DI_{50} (doses do composto capazes de reduzir 50% da resposta nociceptiva quando comparado com o grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. As DI_{50} foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através do programa “Graph Pad Prism” (2005, San Diego, CA).

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste Mann-Whitney, análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste *post hoc* Newman Keuls ou ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* Bonferroni, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância.

4.6 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: ácido acético (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), substância P, prostaglandina E2, bradicinina e forskolina (Sigma, St Louis, MO, EUA), capsaicina e 12-miristato 13-acetato de forbol (Tocris, Cookson Inc., Ellisville, EUA). Todas as substâncias foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl), exceto a capsaicina (diluída em solução salina e DMSO) e o TMDC (diluído em solução salina e Tween 80). A concentração final de DMSO e Tween não excedeu 10% e não apresentou nenhum efeito *per se*.

5 RESULTADOS

5.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES TRPV1 PERIFÉRICOS

Os resultados apresentados na Figura 8 (A-B) demonstram que o TMDC, administrado pelas vias i.pl. e i.t., reduziu significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, com inibição de $73\pm 4\%$ e $64\pm 7\%$, e DI_{50} de 16,48 (6,21-43,7) $\mu\text{g/pata}$ e 17,78 (10,41-30,37) $\mu\text{g/sítio}$, respectivamente. Quando administrado pela via oral (Figura 8C), o composto inibiu apenas $31\pm 4\%$ (dose de 3 mg/kg) a nocicepção induzida pela capsaicina, porém essa atividade antinociceptiva não foi significativa nesse modelo.

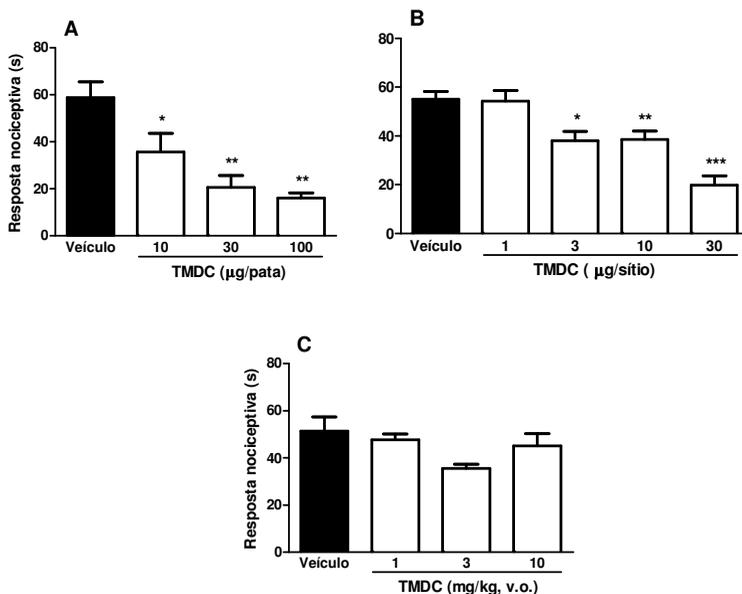


Figura 8. Efeito do TMDC administrado pela via intraplantar (A), intratecal (B), ou oral (C) na nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC pela via i.pl. em associação com a capsaicina, via i.t. 15 min antes, e via oral 1h antes do teste, sendo colocados nas câmaras individuais de observação por pelo menos 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de: 5-6 animais (tratamento i.pl.), 6-8 animais (tratamento i.t.) ou 4-6 animais (tratamento v.o.), e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam

os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pelas mesmas vias que o TMDC).

O decurso temporal da ação antinociceptiva do TMDC, administrado pela via i.p., também foi avaliado no teste da capsaicina. Como pode ser observado na Figura 9, o efeito antinociceptivo do TMDC (1 mg/kg) nesse modelo teve início 0,5 h após sua administração (inibição de $46 \pm 7\%$), e esse efeito durou até 2h após o tratamento (inibição de $50 \pm 7\%$).

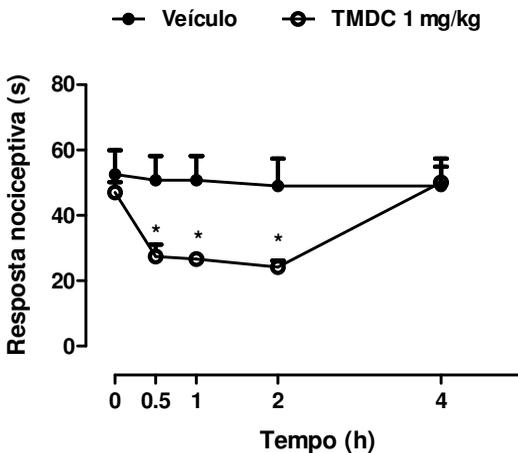


Figura 9. Decurso temporal do efeito antinociceptivo do TMDC, administrado pela via i.p., na nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC e 0; 0,5; 1; 2 e 4 h após os animais foram submetidos ao modelo de nocicepção. Antes da realização do experimento, os camundongos foram colocados nas câmaras individuais de observação por pelo menos 30 min. Cada ponto da curva representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de Newman Keuls): * $P < 0,05$ comparados ao grupo controle (pontos pretos; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).

5.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES TRPV1 MEDULARES

Pode-se observar na Figura 10 que o TMDC, administrado pela via i.p. 30 min antes, foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intratecal de capsaicina (0,2 nmol/sítio) em camundongos, com inibição de $47\pm 9\%$ na dose 10 mg/kg.

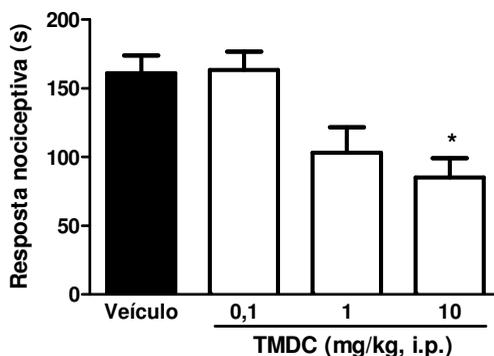


Figura 10. Efeito do TMDC administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intratecal de capsaicina (0,2 nmol/sítio) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).

5.3 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO 2% pH 4

Como pode ser observado na Figura 11, o TMDC (10 mg/kg), administrado pela via i.p. 30 min antes, não foi capaz de inibir a nocicepção espontânea induzida pela administração i.pl. de ácido acético 2% pH 4 em camundongos.

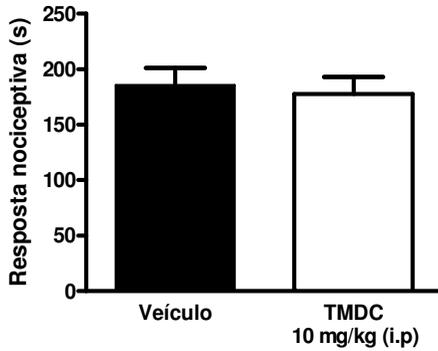


Figura 11. Efeito do TMDC (10 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de ácido acético 2% pH 4 (20 μ l) em camundongos. Os animais foram tratados com TMDC ou solução veículo (5% Tween 80 em solução salina) e colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 5 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Análise estatística realizada através do teste Mann-Whitney.

5.4 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR BRADICININA, PROSTAGLANDINA E2, MIRISTATO-ACETATO DE FORBOL E FORSKOLINA

O tratamento prévio de camundongos com TMDC (10 mg/kg, i.p.) foi capaz de inibir ($43\pm 3\%$) a nocicepção espontânea induzida pela administração i.pl. de bradicinina, mas não reduziu a nocicepção induzida por prostaglandina E2, miristato-acetato de forbol e forskolina (Figura 12).

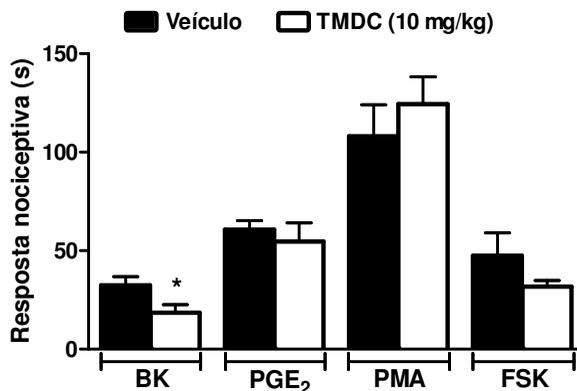


Figura 12. Efeito do TMDC (10 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de bradicinina (BK, 10 nmol/pata), prostaglandina E2 (PGE₂, 0,3 nmol/pata), miristato-acetato de forbol (PMA, 50 pmol/pata) ou forskolina (FSK, 10 nmol/pata) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (teste Mann-Whitney): * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).

5.5 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA P

O tratamento prévio de camundongos com TMDC (1 mg/kg) pela via i.p. foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pela administração i.t. de substância P, com inibição de $89 \pm 2\%$, como pode ser observado na Figura 13.

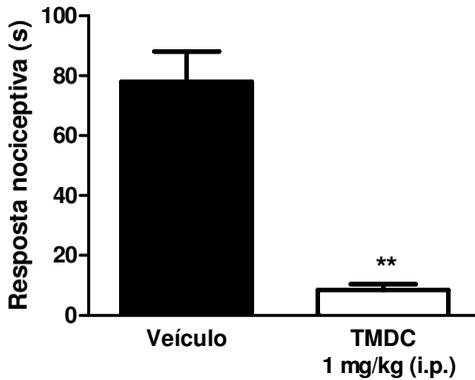


Figura 13. Efeito do TMDC (1 mg/kg) administrado pela via i.p. na nocicepção induzida pela injeção intratecal de substância P (0,1 nmol/sítio) em camundongos. Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (teste Mann-Whitney): ** P < 0,01 comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.).

5.6 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIOIDE

O tratamento prévio de camundongos com o antagonista não seletivo de receptores opioides naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter não somente o efeito antinociceptivo da morfina (1 mg/kg, s.c.) como também reverteu o efeito antinociceptivo do TMDC (1 mg/kg, i.p.) no modelo de nocicepção espontânea induzida pela capsaicina i.pl. Os resultados são mostrados na Figura 14 como médias da duração (tempo em segundos; $n = 5$) do comportamento nociceptivo induzido pela administração i.pl. de capsaicina.

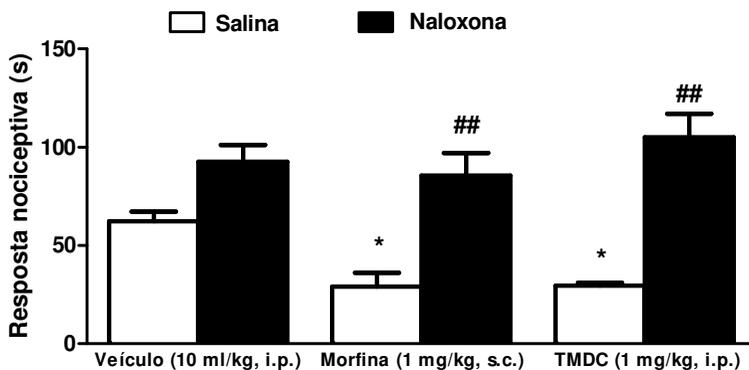


Figura 14. Efeito do tratamento prévio dos camundongos com salina (10 ml/kg, i.p.; grupos controles) ou naloxona (1 mg/kg, i.p.; antagonista não seletivo de receptores opioides) sobre o efeito antinociceptivo do TMDC (1 mg/kg, i.p.) e da morfina (1 mg/kg, s.c.; agonista não seletivo de receptores opioides, utilizada como controle positivo) na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata). Os animais foram colocados nas câmaras individuais de observação 30 min antes da realização do teste. Cada coluna representa a média de 4 a 6 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de duas vias seguida do teste *post hoc* Bonferroni): * $P < 0,05$ comparados ao grupo pré-tratado com salina e solução veículo (5% Tween 80 em solução salina); ## $P < 0,01$ comparado ao grupo pré-tratado com salina e morfina; §§ $P < 0,01$ comparado ao grupo pré-tratado com salina e TMDC.

5.7 PLACA QUENTE

A latência dos animais no teste da placa quente aproximadamente dobrou após o tratamento com TMDC na dose de 10 mg/kg (i.p.) comparado à latência basal dos animais, e também ao grupo de animais que recebeu apenas veículo. O tratamento dos animais com TMDC na dose de 1 mg/kg (i.p.) não demonstrou efeito. Esses resultados estão apresentados na Figura 15.

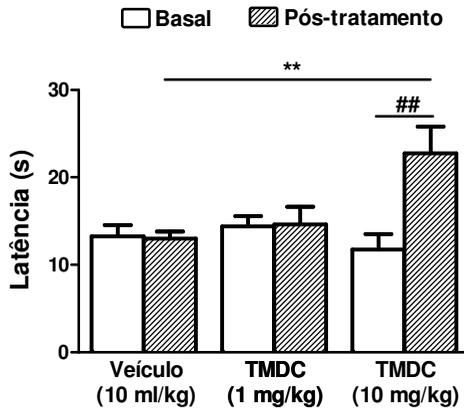


Figura 15: Efeito do TMDC administrado pela via i.p. na latência dos animais expostos à placa quente ($55\pm 1^\circ\text{C}$). A latência basal foi avaliada antes dos tratamentos com TMDC ou solução veículo (Basal; colunas brancas), e 30 min após os animais foram novamente expostos à placa quente (Pós-tratamento; colunas hachuradas). Cada coluna representa a média de 4 a 5 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls): *** $P < 0,01$ comparado ao grupo veículo (animais que receberam solução veículo [5% Tween 80 em solução salina] pela via i.p.), ## $P < 0,01$ diferença entre os grupos basal e pós-tratamento com TMDC 10 mg/kg.

5.8 TEMPERATURA CORPORAL

O tratamento dos camundongos com TMDC, pela via i.p., não alterou a temperatura corporal dos animais tratados com as doses 1 e 10 mg/kg, quando comparados com o grupo tratado apenas com veículo (5% Tween 80 em solução salina). A temperatura foi avaliada nos tempos 0,5; 1; 2 e 4 h após o tratamento. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

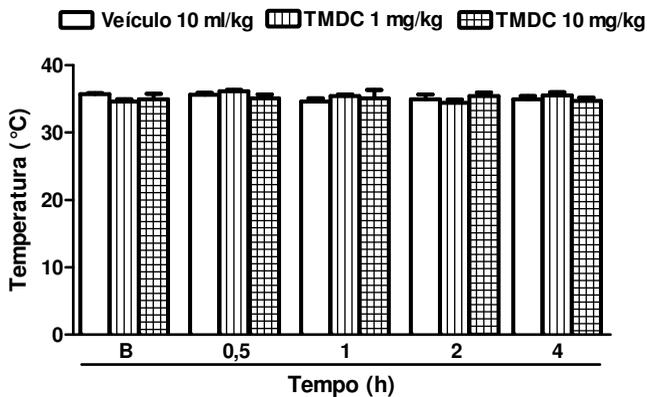


Figura 16: Efeito do TMDC, administrado pela via i.p., na temperatura corporal dos animais ao longo do tempo. A temperatura basal (B) foi avaliada antes dos tratamentos com TMDC ou solução veículo (colunas brancas), e 0,5; 1; 2 e 4 h após a temperatura corporal dos animais foi novamente avaliada. Cada coluna representa a média de 4 a 5 animais, e as linhas verticais os E.P.M. Análise estatística realizada através de ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida do teste de Newman Keuls.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos vem crescendo a procura por novos fármacos analgésicos mais eficazes e desprovidos de efeito colaterais significativos, bem como o estudo e o entendimento da participação dos receptores TRPV1 nos processos dolorosos. Os centros de pesquisa – principalmente localizados nas universidades – tem focado essa pesquisa em produtos naturais com conhecida atividade antinociceptiva, principalmente os oriundos de plantas utilizadas pela sua atividade medicinal.

O nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o TMDC, extraído de *P. tuberculatum*, possui efeito antinociceptivo significativo no modelo de dor visceral caracterizado pelas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (RODRIGUES et al., 2009), sendo esse efeito cerca de 7.700 vezes maior que a aspirina no mesmo modelo. Recentemente, a atividade antinociceptiva do composto foi confirmada em outros modelos animais de nocicepção amplamente utilizados na busca de novos fármacos com propriedades analgésicas. Desta forma, foi observado que a administração i.p. do TMDC em camundongos reduziu significativamente a primeira fase da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina, caracterizada como um modelo de dor neurogênica, com inibição de $72\pm 5\%$ na dose de 3 mg/kg e DI_{50} de 0,20 (0,14-0,29) mg/kg. Da mesma forma, o tratamento de camundongos com TMDC foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela administração i.pl. de capsaicina, um agonista de receptores TRPV1, com inibição de $63\pm 6\%$ na dose de 1 mg/kg e DI_{50} de 0,29 (0,17-0,49) mg/kg.

De fato, a participação dos receptores TRPV1 na fase neurogênica da nocicepção induzida pela formalina é bastante conhecida, enquanto que na fase inflamatória os dados existentes na literatura são um pouco controversos (TIAN et al., 2009). Porém, estudos recentes demonstraram que animais *knock out* para o receptor TRPV1 desenvolveram normalmente o comportamento nociceptivo relacionado com a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (XU et al., 2010).

O conjunto de dados apresentados no presente estudo estende os dados anteriores e demonstra que o TMDC, administrado por diferentes vias (intratecal e intraplantar), foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina. Além disso, quando

administrado por via i.p., o efeito antinociceptivo do TMDC no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina foi observado 30 min após sua administração, e esse efeito se prolonga por até 2 h. Contudo, quando administrado pela via oral, o composto reduz apenas parcialmente o comportamento nociceptivo induzido nesse modelo, não sendo estatisticamente significativo. Uma possível explicação para essa observação é que, quando administrado pela via oral, o composto possa ter alguma metabolização (por exemplo, conjugação de grupos substituintes no grupo hidroxila da molécula) que interfira na sua atividade antinociceptiva.

Uma alternativa bastante utilizada na clínica, que evita a exposição sistêmica do organismo ao fármaco e consequentemente diminui a incidência de efeitos colaterais, é a sua administração tópica. Assim, nesse trabalho avaliou-se o efeito antinociceptivo do TMDC administrado localmente, em conjunto com a capsaicina. Os nossos dados demonstram que o TMDC inibiu significativamente, e de forma dose-dependente, o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de capsaicina, sugerindo que o TMDC pode exercer uma modulação local, pela ação direta no receptor ou, indiretamente, sobre os mecanismos que levam à ativação do receptor TRPV1 periférico.

No presente estudo também foi analisado uma possível ação do TMDC sobre o SNC, considerando que os receptores TRPV1 são densamente expressos no corno dorsal da medula espinal e também em núcleos encefálicos, onde estão relacionados com a transmissão e processamento do estímulo nocivo (TREVISANI; SZALLASI, 2009). Como pode ser observado, o TMDC, administrado centralmente (pela via i.t.) 15 min antes, foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de capsaicina, sugerindo uma ação modulatória do TMDC sobre receptores TRPV1 da medula espinal. Ao inibir a atividade desses receptores, o TMDC poderia bloquear a chegada da informação dolorosa aos níveis superiores, e consequentemente impedir seu processamento. Além disso, o tratamento i.p. (sistêmico) com TMDC foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela administração i.t. (central) de capsaicina, que induz um comportamento nociceptivo característico da ativação dos receptores TRPV1 medulares, o que nos permite inferir que o composto é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. É importante mencionar que fármacos analgésicos capazes de penetrar o SNC possuem atividade analgésica superior aos seus análogos que, por serem pouco lipossolúveis, ficam restritos à periferia. Além disso, esses resultados corroboram a postulação anterior de que o TMDC pode ter alguma

metabolização, quando administrado via oral, que diminua sua lipossolubilidade e reduza a possível modulação dos receptores TRPV1 centrais, diminuindo o efeito antinociceptivo do composto.

Dados da literatura apontam que o receptor TRPV1, além da capsaicina, pode ser ativado por substâncias endógenas, como os prótons presentes nas soluções ácidas (pH < 6,0) liberadas em lesões teciduais. Levando isso em consideração, o efeito do TMDC na nocicepção induzida por solução ácida (ácido acético 2% pH 4,0) também foi analisado no presente trabalho. Porém, quando administrado pela via i.p., o TMDC não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo induzido pela administração i.pl. de solução ácida. MEOTTI et al. (2007) demonstraram que, além dos receptores TRPV1, outros moduladores endógenos participam desse modelo de nocicepção, como os receptores ionotrópicos de glutamato NMDA, canais ASICs (*acid sensing ion channels*) e a enzima ciclo-oxigenase (COX). Assim, apesar da possível ação do TMDC sobre a ativação de receptores TRPV1, existem outras vias de sinalização que levam ao comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de ácido acético 2% pH 4, e que podem não ser moduladas pelo TMDC. Porém, são necessários estudos adicionais para se confirmar tal teoria.

Esse trabalho também investigou o efeito antinociceptivo do TMDC sobre as vias de sinalização que podem levar a sensibilização dos receptores TRPV1, utilizando-se modelos de nocicepção espontânea caracterizados pela ativação dos receptores de bradicinina, prostaglandina E2, e das proteínas quinase associadas (PKC e PKA). O pré-tratamento dos animais com TMDC inibiu significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de bradicinina, porém o mesmo tratamento não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pelas injeções i.pl. de prostaglandina E2, de um ativador da PKC, o PMA, ou de um ativador da PKA, a forskolina. Sabe-se que a ativação dos receptores de bradicinina pode levar à sensibilização dos receptores TRPV1, principalmente pela da ativação da PKC. Além disso, FERREIRA et al. (2005) demonstraram que a nocicepção espontânea induzida por PMA em camundongos é inibida pelo SB366791, mas não pela capsazepina, sendo ambos antagonistas de receptores TRPV1. De fato, a aplicação de capsazepina em cultura de células que expressam receptores TRPV1 de camundongos inibiu apenas as correntes mediadas por capsaicina, não alterando as correntes produzidas por prótons ou PMA (CORRELL et al., 2004), e o mesmo antagonista não foi capaz de inibir a sensibilização a prótons dos receptores TRPV1 induzida pela ativação da PKC α (OLAH et al., 2002). Os nossos dados demonstram que o

TMDC não foi capaz de inibir a ativação dos receptores TRPV1 induzida por prótons, sugerindo uma ação moduladora semelhante à capsazepina. Assim, ainda pode-se sugerir que o TMDC age em algum ponto da cascata de sinalização que precede a ativação da PKC, uma vez que a nocicepção induzida pela injeção de PMA não foi inibida pelo TMDC. No entanto, essa ação do composto sobre a sensibilização induzida pela PKC do receptor TRPV1 precisa ser melhor investigada.

A participação de receptores de B1R de bradicinina também foi demonstrada na nocicepção espontânea induzida por PMA (FERREIRA et al., 2005), sendo que a administração de PMA na pata de camundongos leva a um aumento na expressão desses receptores, enquanto que os receptores B2R tem pouca participação nesse modelo. A bradicinina exerce seus efeitos fisiológicos através de dois receptores: B1R e B2R. Tipicamente, os receptores para bradicinina do tipo B2R são constitutivamente expressos, enquanto que a expressão dos receptores B1R é induzida em estados inflamatórios, sendo expresso de forma constitutiva apenas em algumas regiões do SNC (medula espinal e áreas encefálicas). Por outro lado, a nocicepção espontânea induzida pela bradicinina aplicada na pata de camundongos se dá, principalmente, pela ativação de receptores B2R. Essa afirmação poderia explicar a ação antinociceptiva do TMDC no modelo de nocicepção induzida pela bradicinina, nos levando a inferir que o mesmo exerce seu efeito pela modulação negativa dos receptores B2R, mas não possuindo ação sobre a ativação de receptores B1R.

Marcações imuno-histoquímicas apontam uma coexpressão de receptores TRPV1 centrais e NK-1 (o receptor para substância P), e estudos mostram que essa expressão é funcional, onde a ativação do receptor NK-1 leva à fosforilação do receptor TRPV1, aumentando sua probabilidade de ativação (ZHANG et al., 2007). Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que o tratamento prévio de camundongos com TMDC inibe o comportamento nociceptivo induzido pela administração i.t. de SP, sugerindo uma possível ação do TMDC sobre receptores NK-1. Além disso, a ativação do receptor NK-1 pela SP leva à ativação da proteína Gq/11, que resultará na ativação da fosfolipase C- β (QUARTARA; MAGGI, 1998) e consequente ativação da PKC. De fato, a sensibilização dos receptores TRPV1 pela ativação dos receptores NK-1 acontece via PKC (ZHANG et al., 2007). Os nossos dados demonstram que o TMDC não exerce seu efeito via modulação da PKC, mas é capaz de modular a ativação de receptores de bradicinina, principalmente do receptor B2R. As ações fisiológicas desencadeadas pela ativação do receptor de bradicinina B2R ocorrem

devido à interação com a proteína G, principalmente do tipo Gq/11 (KUHRE et al., 2010). Assim, pode-se sugerir também que o TMDC exerce seu efeito antinociceptivo através de uma modulação negativa da proteína Gq/11, impedindo a ativação da via de sinalização que levaria à sensibilização dos receptores TRPV1. Contudo, experimentos complementares são necessários para confirmar tal hipótese.

Estudos recentes demonstram uma possível ação sinérgica entre receptores TRPV1 e o sistema opioide. De fato, receptores TRPV1 e μ -opioides são co-localizados em neurônios do gânglio da raiz dorsal e também na medula espinal (CHEN; PAN, 2006; CHEN et al., 2008), e o pré-tratamento de ratos com capsaicina é capaz de bloquear o efeito antinociceptivo da morfina, um agonista de receptores μ -opioides (JANCOSO; JANCOSO-GABOR, 1980). Desse modo, foi avaliada a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do TMDC, e os dados do presente trabalho demonstram que a naloxona (um antagonista de receptores μ -opioides) reverte esse efeito, sugerindo que o composto testado poderia induzir a liberação de opioides endógenos, contribuindo para a ativação do controle descendente inibitório e consequentemente para seu efeito antinociceptivo no modelo da capsaicina. Além disso, sabe-se que a capsaicina induz uma liberação de SP e CGRP na medula espinal que é prevenida pelo tratamento com morfina, sendo que o pré-tratamento com naloxona reverte esse efeito (NGUYEN et al., 2010). Considerando que o TMDC inibe o comportamento nociceptivo induzido pela administração i.t. de SP em camundongos, pode-se ainda sugerir que a naloxona reverte o efeito do TMDC no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina ao aumentar os níveis de SP na medula espinal, bloqueando o efeito antinociceptivo do TMDC. Esse efeito da naloxona também pode explicar porque o tratamento dos animais com naloxona aumentou (apesar de não ser estatisticamente significativo) a duração do comportamento nociceptivo dos animais que receberam apenas veículo (Figura 14). Além disso, o tratamento dos animais com morfina não inibiu completamente o efeito nociceptivo da capsaicina. Uma possível explicação para esse fato é que o tratamento com morfina aumenta os níveis de quimiocinas e citocinas na medula espinal, e esses mediadores endógenos, ao interagir com receptores TRPV1 causam sua ativação, se opondo ao efeito antinociceptivo induzido pela morfina (HUTCHINSON et al., 2008).

O teste da placa quente, onde os animais são expostos a uma placa mantida com temperatura de $55 \pm 1^\circ\text{C}$, avalia respostas moduladas e organizadas em níveis supra-espinais a um estímulo nocivo, demonstrando uma ação analgésica intrínseca do composto testado

causada pela liberação de opioides endógenos (GUNN et al., 2011). Os nossos resultados demonstram que o pré-tratamento dos animais com TMDC na dose de 10 mg/kg (mas não na dose de 1 mg/kg) aumentou a latência dos animais no teste da placa quente. Por outro lado, a administração de capsazepina (antagonista TRPV1) não modifica os limiares dos animais na placa quente, sugerindo que o bloqueio seletivo de receptores TRPV1 parece não ser suficiente para prevenir o processamento da sensação dolorosa (NGUYEN et al., 2010). Essa afirmação, em conjunto com os resultados apresentados no presente estudo, permite-nos sugerir que o TMDC possui um efeito analgésico/antinociceptivo intrínseco e embasa a observação feita anteriormente de que o TMDC exerce seu efeito antinociceptivo ao modular a transmissão da informação nociceptiva em níveis superiores do SNC, possivelmente através da liberação de opioides endógenos e interação com receptores TRPV1 centrais e suas vias de sensibilização.

A maioria dos antagonistas de receptores TRPV1 produz uma hipertermia em pacientes humanos que é resistente ao tratamento com antipiréticos convencionais, o que diminui sua utilização segura na clínica (GAVVA et al., 2008; ROSSATO et al., 2011). Sabendo disso, o presente estudo acompanhou a temperatura corporal de animais tratados com TMDC nas doses de 1 e 10 mg/kg – doses capazes de inibir a nociceção nos modelos testados – e pode-se concluir que o TMDC não altera a temperatura corporal dos animais tratados. Essa observação vai ao encontro a estudos recentes que demonstram que antagonistas de receptores TRPV1 que não inibem as correntes ativadas por prótons nesses receptores não induzem hipertermia (WATABIKI et al., 2010), e os nossos dados mostram que o TMDC não é capaz de inibir o comportamento nociceptivo induzido pela solução ácida que levaria à ativação de receptores TRPV1. No entanto, estudos eletrofisiológicos são necessários para confirmar essa hipótese.

A pesquisa por compostos naturais capazes de modular a atividade dos receptores TRPV1 vem crescendo nos últimos anos, sendo expressivo o número desses compostos obtidos de plantas que já estão sendo aplicados em testes clínicos, principalmente indicados para o tratamento da dor (TREVISANI; SZALLASI, 2009). No entanto, a descoberta de novos fármacos continua sendo uma atividade de alto risco, pois o tempo e os custos de descobrir e desenvolver esses compostos continuam sendo um desafio, bem como as metodologias para traduzir os esforços dessa investigação em medicamentos disponíveis na clínica que atendam às necessidades das pessoas com dor. Os recursos biológicos existem, mas o acesso e a investigação são

problemáticos, especialmente se houver pressão por um curto espaço de tempo para essa descoberta.

Além disso, aumentar a pesquisa sobre as plantas medicinais nativas de regiões tropicais é extremamente relevante como estímulo adicional ao estudo e preservação das espécies, pois devido às suas excelentes propriedades medicinais, as plantas sofreram exploração predatória excessiva nos últimos anos e correm o risco de desaparecerem mesmo antes dos estudos ecológicos e agrônômicos estarem completos. A extração constante de plantas medicinais típicas de regiões endêmicas é uma ameaça à perpetuação das espécies nativas e já levaram à extinção diversas plantas cuja atividade farmacológica já foi confirmada, em adição àquelas cujas propriedades ainda estão sob investigação (SOARES et al., 2005). Assim, uma vez identificados os compostos isolados responsáveis pela ação medicinal da planta, deve-se recorrer aos estudos que busquem sintetizar essas moléculas de interesse, diminuindo a extração predatória de plantas nativas.

Em suma, os resultados apresentados nesse trabalho permitem sugerir que o efeito antinociceptivo do TMDC se deve à liberação de opioides endógenos e à inibição da atividade dos receptores TRPV1 periféricos e centrais. Além disso, O TMDC parece ser capaz de modular negativamente a atividade dos receptores NK-1 e B2R. Essas observações nos levam a sugerir que o TMDC seja uma molécula de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados na terapêutica da dor clínica. Contudo, estudos adicionais de estrutura química, atividade biológica e toxicidade são necessários visando à comprovação da sua eficácia no controle da dor.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo nos permitem concluir que:

- ✓ O TMDC, administrado via i.p., exerceu efeito antinociceptivo no modelo da injeção i.pl. de capsaicina, observado 30 min após sua administração, se estendendo por até 2 h;
- ✓ A administração i.pl. do TMDC, em conjunto com a capsaicina, foi capaz de inibir o comportamento antinociceptivo induzido pela ativação dos receptores TRPV1 periféricos;
- ✓ O TMDC, administrado via i.t. 15 min antes, inibiu a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina. Além disso, quando administrado via i.p., o TMDC inibiu o comportamento nociceptivo da capsaicina administrada via i.t.;
- ✓ A administração i.p. do TMDC inibiu a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de bradicinina, mas não a nocicepção induzida por prostaglandina E2, miristato-acetato de forbol (ativador PKC) nem forskolina (ativador PKA);
- ✓ Além disso, a administração i.p. do TMDC inibiu o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.t. de substância P;
- ✓ A naloxona, antagonista de receptores μ -opioides, reverteu o efeito antinociceptivo do TMDC, administrado via i.p., no modelo da capsaicina;
- ✓ O TMDC, administrado via i.p., aumentou a latência dos camundongos tratados com a dose de 10 mg/kg no teste da placa quente;
- ✓ A administração i.p. do TMDC não alterou a temperatura corporal dos animais tratados.

Esse conjunto de dados nos permite concluir que o TMDC exerce um efeito antinociceptivo significativo, sem causar efeitos colaterais importantes. Portanto, esse composto pode representar uma molécula de interesse terapêutico para o tratamento de patologias relacionadas à dor, principalmente por ser capaz de modular a ativação dos receptores TRPV1. Porém, estudos adicionais são necessários para se desvendar o

mecanismo de ação exato desse composto, bem como estudos de toxicidade e estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO-JÚNIOR JX et al. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 325-327. 1999.
- BANDELL M et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857. 2004.
- BARON R, MAIER C. Painful neuropathy: C-nociceptor activity may not be necessary to maintain central mechanisms accounting for dynamic mechanical allodynia. *Clin. J. Pain* 11: 63-9. 1995.
- BENEVIDES PJC, SAARTORELLI P, KATO MJ. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* 52: 339-343. 1999.
- BEZERRA DP et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid-amides from *Piper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 801-807. 2006.
- BEZERRA DP et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol. In Vitro.* 21: 1-8. 2007.
- BEZERRA DP et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J. Appl. Toxicol.* 28: 156-163. 2008.
- BJORDAL JM et al. Short-term efficacy of pharmacotherapeutic interventions in osteoarthritic knee pain: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Eur. J. Pain* 11: 125-138. 2007.
- BROWNSTEIN MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5391-5393. 1993.
- CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 179-189. 2000.
- CATERINA MJ et al. The capsaicin receptor: a heat - activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824. 1997.

CATERINA MJ et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313. 2000.

CHAVES MCO, JÚNIOR AGF, SANTO BVO. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. *Fitoterapia* 74: 181-183. 2003.

CHEN SR, PAN HL. Loss of TRPV1-expressing neurons reduces spinal mu opioid receptors but paradoxically potentiates opioid analgesia. *J. Neurophysiol.* 95: 3086-3096. 2006.

CHEN Y, GEIS C, SOMMER C. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Neurosci.* 28: 5836-5845. 2008.

CÍCERO BEZERRA FELIPE F et al. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressive effects in mice. *Phytomedicine* 14: 605-612. 2007.

COLLIER HDJ et al. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 32: 295-310. 1968.

CORRELL CC et al. Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. *Neurosci. Lett.* 370: 55-60. 2004.

CORTRIGHT DN, KRAUSE JE, BROOM DC. TRP channels and pain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1772: 978-988. 2007.

COSTIGAN M, WOOLF CJ. Pain: molecular mechanisms. *J. Pain* 1: 35-44. 2000.

CRANDALL, M et al. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 98: 109-117. 2002.

CRONQUIST A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York Colombia University Press. 1981.

DYER LA, PALMER ADN. *Piper*: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution. Kluwer Academic Publisher, New York. 2004.

FACUNDO VA, PINTO ASS, DE MORAIS SM. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 753-756. 2005.

FENG Y, CUI M, WILLIS W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 98: 729-733. 2003.

FERREIRA J et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 117: 171-181. 2005.

FINNERUP NB, SINDRUP SH, JENSEN TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150: 573-581. 2010.

GAVVA NR et al. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323: 128-137. 2007.

GAVVA NR et al. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136: 202-210. 2008.

GUIMARÃES EF, GIORDIANO LCS. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. *Rodriguesia* 55: 21-25. 2004.

GUNN A et al. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J. Pain* 12: 222-227. 2011.

GUNTORPE MJ, CHIZH BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. *Drug Discov. Today* 14: 56-67. 2009.

HUDSON LJ et al. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 13: 2105-2114. 2001.

HUTCHINSON MR et al. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain Behav. Immun.* 22: 1178-1189. 2008.

HYLDEN KL, WILCOX GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *European J. Pharmacol.* 67: 313-316. 1980.

HWANG SW et al. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 6155-6160. 2000.

IKEDA Y et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci.* 69: 2911-2919. 2001.

JANCZO G, JANCZO-GABOR A. Effect of capsaicin on morphine analgesia – possible involvement of hypothalamic structures. *Naunyn Schmiedebergs Acta Pharmacol.* 311: 285-288. 1980.

JOLY AB. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal, 10^a ed. Ed. Nacional, São Paulo. 1991.

JULIUS D; BASBAUM AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210. 2001.

KANDEL ER et al. Principles of neural science. McGraw-Hill, Nova York. 2000.

KASSUYA CA et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behavior and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br. J. Pharmacol.* 150: 727-737. 2007.

KNOTKOVA H, PAPPAGALLO M, SZALLASI A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin. J. Pain* 24: 142-154. 2008.

KUHR F et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44: 145-154. 2010.

LATREMOLIERE A; WOOLF CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain* 10: 895-926. 2009.

LEAL LF. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de Piper mikanianum (Kunth) Steudel. 158f. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Universidade Federal de Santa Catarina. 2000.

LI JW-H, VEDERAS JC. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325: 161-165. 2009.

LOESER JD; TREEDE RD. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 137: 473-477. 2008.

LONGHI-BALBINOT DT. Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do triterpeno 3,6,16-tridroxilup-20(29)-eno (TTHL) isolado de *Combretum leprosum*. 106 f. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

LORENZI H; MATOS FJA. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum. Nova Odessa, São Paulo. 2002.

LUIZ, A.P., et al. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. *J. Ethnopharmacol.* 114: 355-363. 2007.

LUO H et al. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport* 15: 655-658. 2004.

MC CURDY CR, SCULLY SS. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sciences* 78: 476-484. 2005.

MEOTTI FC, COELHO IS, SANTOS ARS. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. *J. Pain* 11: 570-578. 2010.

MILLAN MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 66: 355-474. 2002.

MOORE RA et al. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of information from company clinical trial reports. *Arthritis Res. Ther.* 7: R644-R665. 2005.

MOREIRA DL, KAPLAN MAC, GUIMARÃES EF. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC. (PIPERACEAE). *Revista Brasileira de Farmácia* 76(4): 106-109. 1995.

NASCIMENTO FP et al. Inosine reduces pain-related behaviour in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334: 590-598. 2010.

NGUYEN T-L et al. Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. *Brit. J. of Anaesth.* 105: 668-674. 2010.

OLAH Z, KARAI L, IADAROLA MJ. Protein kinase C (alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277: 35752-35759. 2002.

PAL M et al. Vanilloid receptor antagonists: emerging class of novel anti-inflammatory agents for pain management. *Curr. Pharm. Des.* 15: 1008-1026. 2009.

PREMKUMAR LS, AHERN GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408: 985-990. 2000.

QUARTARA L, MAGGI CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distributions and pathophysiological roles. *Neuropeptides* 32: 1-49. 1998.

RAJA IA, AZZONI A, MAISTO G. Three cases of improvement of tardive dyskinesia following olanzapine treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2: 333-334. 1999.

REMADEVI R, SZALLISI A. Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for longlasting pain relief. *Drugs* 11: 120-132. 2008.

RIBEIRO RA et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 111-118. 2000.

ROCHA APC et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 57: 94-105. 2007.

RODRIGUES RV. Estudo fitoquímico dos frutos de *Piper tuberculatum* (Jacq.) e avaliação da atividade antinoceptiva e antiinflamatória dos extratos e constituintes identificados: pipartina, dihidropipartina, e ácido 3,4,5-trimetóxi-dihidrocinâmico. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia. 2009

RODRIGUES RV et al. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. *Bio. & Pharm. Bull.* 32: 1809-1812. 2009.

ROSSATO MR et al. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem. Pharmacol.* 81: 544-551. 2011.

ROSSATO MF et al. Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. *J. Pain* 11: 545-54. 2010.

ROSSATO MF et al. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem. Pharmacol.* 81: 544-551. 2011.

SOARES AM et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr. Medicin. Chem.* 12: 2625-2641. 2005.

TIAN LJ et al. Mediating roles of the vanilloid receptor TRPV1 in activation of rat primary afferent nociceptive neurons by formaldehyde. *Sheng Li Xue Bao* 61: 404-416. 2009.

TJØLSEN A, HOLE K. “The pharmacology of pain”. In: DICKENSON A, BESSON J. (ed.) Springer Verlag, Berlin. 1997.

TOMINAGA M. Nociception and TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179: 489-505. 2007.

TREVISANI M, SZALLASI A. Vanilloid (TRPV1) and Other Transient Receptor Potential Channels. In: CAIRNS BE (ed.) *Peripheral Receptor Targets for Analgesia: Novel Approaches to Pain Management*. John Wiley & Sons, Inc. 2009.

TSAI IL et al. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignin and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. *Planta Medica* 71: 535-542. 2005.

VANDERAH TW. Pathophysiology of Pain. *The Medical Clinics of North America*. 91: 1-12. 2007.

VINEGER R et al. “Handbook of experimental pharmacology”. In: VANE JR, FERREIRA SH. (ed.) Springer Verlag, Berlin. 1979.

XU ZZ et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat. Med.* 16: 592-597. 2010.

WALTERS ET. Evolutionary aspects of pain. In: BASBAUM AI, BUSHNELL MC (ed.). *Science of pain*. Elsevier, 2009.

WANG H et al. Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol. Chem.* 387: 11-14. 2006.

WANG S et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131: 1241-1251. 2008.

WATABIKI T et al. Amelioration of neurophatic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS19283790 in rats without hyperthermic effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336: 743-750. 2011.

WONG GY, GAWA NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res. Rev.* 60: 267-277. 2009.

WOOLF CJ. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br. J. Anaesth.* 63: 139-146. 1989.

WOOLF CJ, MANNION RJ, NEUMANN S. Null mutations lacking substance: Elucidating pain mechanisms by genetic pharmacology. *Neuron* 20: 1063-1066. 1998.

WOOLFE G, MACDONALD AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80: 300-7. 1944.

YUNES RA, CALIXTO JB. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. 1ª edição, Chapecó-SC, Argos – Editora Universitária. Cap. 7, p. 297-315. 2001.

ZHANG H et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKC ϵ : A novel pathway for heat hyperalgesia. *J. of Neurosci.* 27: 12067-12077. 2007.

ZHOU Y et al. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacol.* 41: 601-608. 2001.

ZHU CZ et al. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. *Eur. J. Pharmacol.* 506: 107-118. 2004.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110. 1983.