

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos
pentacíclicos α - e β - amirina em modelos de
nocicepção visceral em camundongos**

ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR

FORTALEZA-CE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos
pentacíclicos α - e β - amirina em modelos de
nociceção visceral em camundongos.**

Roberto César Pereira Lima Júnior

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos

2005

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MISTURA DE TRITERPENOS
PENTACÍCLICOS α - E β - AMIRINA EM MODELOS DE
NOCICEPÇÃO VISCERAL EM CAMUNDONGOS**

ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Data da aprovação: 01/07/2005

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará

**A Deus, por sempre ter me guiado
através dos tortuosos caminhos da
vida**

**Aos meus pais Roberto César Pereira
Lima e Maria Aureana Costa Lima,
pela presença e constante orientação
em todas as etapas de que
envolveram a formação do meu
caráter**

**Aos meus irmãos Denis e Marina, pela
incontestável amizade**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Flávia Almeida Santos pela constante presença como professora, pela orientação neste valoroso trabalho e acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao por ter visto em mim uma oportunidade de investimento intelectual e pela co-orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Francisco de Assis Oliveira pelo amigo que nele descobri e por ter diretamente contribuído para a realização deste estudo, apresentando-me aquela a qual carinhosamente chamamos “ α - e β - menina”.

À Profa Dra. Mariana Chaves pelo fornecimento da mistura dos triterpenos α - e β - amirina, a base de realização deste trabalho.

À Profa. Adriana Rolim Campos e aos Doutorandos Jéferson Falcão do Amaral e Karina Moreira de Alencar que sem dúvidas entraram no “hall” das minhas grandes amizades.

À Profa. Luilma Albuquerque pelas longas horas de contribuição nos meus experimentos e pelo inestimável companheirismo.

À Dra. Regilane Matos da Silva pelos inesquecíveis momentos de alegria proporcionados a mim e a todos do LPN.

Às mestrandas Juliana Maia Lemos e Caroline Mourão pela amizade que indubitavelmente se eternizará.

À amizade dos companheiros bolsistas de iniciação científica do LPN Alana, Bruno, Cinthia, Deive, Ítalo, Jonnathann, Lívia e às farmacêuticas

Wilcare de Medeiros e Kelcyana Santos pelo interesse e incansável participação na realização do meu trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Produtos Naturais, Aline e Karina, pela manutenção da organização deste que é o berço de formação de grandes profissionais e pela contribuição nos experimentos.

À querida Danielle de Abreu Barreto pela inesgotável paciência nos meus momentos de necessária ausência.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aura, Chiquinho, Edmílson, Fernando, Íris, Joana, Marta, Rose e Sílvia.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

**“Recebei a instrução e não o dinheiro.
Preferi a ciência ao fino ouro,
pois a Sabedoria vale mais que as pérolas
e jóia alguma a pode igualar”
(Provérbios 8, 10-11)**

SUMÁRIO

Lista de Siglas	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Nocicepção	3
1.2.1. Definição de dor	3
1.2.2. Classificação dos tipos de dor	4
1.2.3. Mecanismos da dor	5
1.2.3.1. Transdução da informação nociceptiva	5
1.2.3.2. Transmissão da informação nociceptiva	6
1.2.3.3. Modulação da informação nociceptiva	8
1.2.4. Participação de mediadores na dor	9
1.2.5. Dor visceral	13
1.2.5.1. Modelos para o estudo da dor visceral	15
1.3. Farmacologia de compostos terpênicos	17
1.4. <i>Protium heptaphyllum</i> March.	19
1.4.1. Óleo-resina	20
1.4.2. α - e β - amirina	20
1.5. Relevância e Justificativa	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS	27
3.1. Material botânico	27
3.2. Animais experimentais	27
3.3. Drogas e reagentes	28
3.4. Equipamentos	28
4. MÉTODOS	30

4.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α - e β - amirina	30
4.2. Estudo da atividade antinociceptiva visceral	32
4.2.1. Dor visceral induzida por ciclofosfamida	32
4.2.2. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	32
4.2.3. Dor visceral induzida por óleo de mostarda	32
4.2.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide	33
4.2.3.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico	34
4.2.3.3. Estudo do envolvimento do receptor da capsaicina (TRPV1)	34
4.3. Teste do Tempo de Sono induzido por Pentobarbital	35
4.4. Teste do Campo Aberto	36
4.5. Teste do Rota Rod	36
4.6. Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α - e β - amirina	39
5.2. Estudo da atividade antinociceptiva visceral	39
5.2.1. Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida	39
5.2.2. Efeito de α - e β - amirina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	40
5.2.3. Efeito da α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por Óleo de Mostarda	45
5.2.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide	45
5.2.3.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico	50
5.2.3.3. Estudo do envolvimento do receptor da capsaicina (TRPV1)	50
5.3. Efeito da α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital	55
5.4. Efeito da α - e β - amirina no teste do campo aberto	55
5.5. Efeito da α - e β - amirina no teste do Rota Rod	55
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE SIGLAS

±	mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
5-HT	Serotonina
5-HETE	ácido 5-hidroxeicosatetraenóico
12-HPETE	ácido 12-hidroperoxieicosatetraenóico
15-HETE	ácido 15-hidroxeicosatetraenóico
15-HPETE	ácido 15-hidroperoxieicosatetraenóico
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μL	Microlitro
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
AMPA	ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
B ₂	Receptor para bradicinina 2
Ca ²⁺	Íon cálcio
CFM	Ciclofosfamida
c-fos	Oncogen c-fos
CGRP	Peptídio Relacionado ao Gene da Calcitonina
D ₂	Receptor para dopamina
E.P.M.	Erro padrão da média
et al.	...e colaboradores
g	Gramma
h	Hora
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramma
M ₂	Receptor muscarínico tipo 2
M ₄	Receptor muscarínico tipo 4
mg	Miligramma
min.	Minuto
mL	Mililitro
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NK1	Neurocinina 1
NMDA	N-metil-D-aspartato
°C	Grau centígrado
p	Nível de significância
P2Y2	Receptor metabotrópico purinérgico subtipo 2
P.A.	Para análise
PDE4	Fosfodiesterase tipo 4
PKC	Proteína Kinase C
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s.c.	sub-cutâneo

SNC	Sistema Nervoso Central
SG	Substância Gelatinosa
SP	Substância P
Tf	Tempo final de sono
Ti	Tempo de início do sono
TrkA	Tirosina kinase A
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloide 1
TS	Tempo de sono
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	via oral
VR1	Receptor Vanilóide 1
vs	Versus

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 -	Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida em camundongos	41
Tabela 2 -	Efeito de α - e β - amirina no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	43
Tabela 3 -	Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos	46
Tabela 4 -	Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva de α - e β - amirina e morfina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda intracolônico em camundongos	48
Tabela 5 -	Efeito da ioimbina na antinocicepção de α - e β - amirina e clonidina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos	51
Tabela 6 -	Efeito do vermelho de rutênio sobre a antinocicepção de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos	53
Tabela 7 -	Efeito da α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	56
Tabela 8 -	Efeito da α - e β - amirina no teste do campo aberto em camundongos	58
Tabela 9 -	Efeito da α - e β - amirina no teste do rota rod em camundongos	60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Representação esquemática dos neurônios das vias ascendentes viscerais e sinapses medulares e talâmicas	7
Figura 2 -	Reflexo axônico. A liberação de substância P potencializa a inflamação e dor por causar a liberação de histamina e vasodilatação	10
Figura 3 -	Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> March	22
Figura 4 -	Fotografia ilustrando folhas e frutos do <i>Protium heptaphyllum</i>	22
Figura 5 -	Fotografia ilustrando queima do exsudato óleo-resinoso do <i>Protium heptaphyllum</i>	22
Figura 6 -	Estrutura dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina	23
Figura 7 -	Processo de isolamento da mistura dos triterpenos α - e β - amirina da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> March	31
Figura 8 -	Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida em camundongos	42
Figura 9 -	Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	44
Figura 10 -	Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos	47
Figura 11 -	Estudo do envolvimento do sistema opióide no mecanismo de ação da α - e β - amirina	49
Figura 12 -	Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico no mecanismo de ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina	52
Figura 13 -	Estudo do envolvimento do receptor vanilóide no mecanismo de ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina	54

Figura 14 -	Efeito da mistura dos triterpenos α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos	57
Figura 15 -	Estudo da ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina no teste do campo aberto em camundongos	59
Figura 16 -	Estudo da ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina no teste do rota rod	61

RESUMO

Efeito antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos α - e β -amirina em modelos de nociceção visceral em camundongos. Roberto César Pereira Lima Júnior. Orientadora: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2005. O *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae), uma planta medicinal encontrada na região Amazônica e Nordeste do Brasil, produz uma resina rica em triterpenos pentacíclicos, como a mistura binária α - e β - amirina, que apresentam atividade antiinflamatória, gastroprotetora e antinociceptiva. Este trabalho objetivou investigar a atividade antinociceptiva de α - e β - amirina em modelos de dor visceral induzida por ciclofosfamida, ácido acético e óleo de mostarda em camundongos, além dos possíveis mecanismos de ação envolvidos. No modelo de nociceção visceral induzida por ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.), a mistura de triterpenos nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, v.o., reduziu ($p < 0,001$) de forma dose-dependente o tempo de expressão dos comportamentos relacionados à dor visceral (59,7; 75,5 e 92,3%, respectivamente, versus o controle ciclofosfamida $12,25 \pm 2,98$ min). Realizou-se o estudo nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%, 10mL/kg, i.p.) e dor visceral induzida por óleo de mostarda (0,75%, 50 μ L/animal) intracolônico. Os resultados indicaram uma inibição do número de comportamentos de dor expressos pelos animais, sendo o maior nível de inibição ($p < 0,001$) encontrado na dose de 10 mg/kg da α - e β - amirina 50,4% e 61,1% comparados respectivamente ao controle ácido acético ($42,33 \pm 3,78$ contorções/20min) no teste de contorções abdominais e ao controle óleo de mostarda ($39,28 \pm 3,26$) no modelo de dor visceral por óleo de mostarda. Para o estudo do possível mecanismo de ação de α - e β - amirina foi utilizada a dose de 10 mg/kg da mistura de triterpenos no modelo de nociceção por óleo de mostarda. Na avaliação da participação do sistema opióide, a mistura dos triterpenos e a morfina (5 mg/kg, s.c.) inibiram significativamente ($p < 0,001$) o número de comportamentos de dor expressos, havendo uma reversão da antinociceção ($p < 0,05$) quando pré-tratados com naloxona (2 mg/kg, i.p.), sugerindo a participação opióide no mecanismo da α - e β - amirina. No estudo do envolvimento do sistema adrenérgico, a mistura de triterpenos e a clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), um agonista α_2 -adrenérgico, inibiram ($p < 0,001$) a expressão dos comportamentos nociceptivos. Porém, com o pré-tratamento com ioimbina, um antagonista α_2 , houve reversão ($p < 0,05$) da antinociceção induzida pela clonidina, mas não da α - e β - amirina, sugerindo o não envolvimento deste receptor na antinociceção da mistura de triterpenos. No estudo do envolvimento do receptor TRPV1, o pré-tratamento dos animais com α - e β - amirina, vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.), um antagonista não competitivo deste receptor, ou com a combinação da mistura de triterpenos com vermelho de rutênio, houve uma inibição ($p < 0,001$) semelhante, para todos os tratamentos, dos comportamentos de dor. A não potencialização, ou antagonismo, do efeito antinociceptivo de α - e β - amirina pelo vermelho de rutênio sugere que a mistura atue como um antagonista não-competitivo TRPV1. Para avaliar a existência de um efeito sedativo, de um impedimento locomotor ou de uma incoordenação motora, foram utilizados os testes do

tempo de sono induzido por pentobarbital, teste do campo aberto e o teste do rota rod, respectivamente. Os dados indicaram que o tratamento com a mistura de triterpenos (10 mg/kg) não induziu ($p>0,05$) sedação, impedimento locomotor ou incoordenação motora nos animais, sendo ainda capaz de reverter ($p<0,05$) o impedimento locomotor induzido pelo óleo de mostarda no teste do campo aberto. Em conjunto os dados revelaram a efetividade da mistura de α - e β - amirina em modelos de nocicepção visceral possivelmente envolvendo receptores opióides e TRPV1.

Palavras-chave: Burseraceae, dor visceral, triterpenos, receptor opióide, receptor TRPV1.

ABSTRACT

Antinociceptive effect of the mixture of pentacyclic triterpenes α - and β -amyrin in models of visceral nociception in mice. Roberto César Pereira Lima Júnior. Principal guide: Dr. Flávia Almeida Santos. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2005. *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae), a medicinal plant commonly found in the Amazon and in the Northeast regions of Brazil, releases an oil-resin rich in pentacyclic triterpenes, such as the binary mixture of α - and β - amyrin, that manifests antiinflammatory, antinociceptive and gastroprotective properties. This work was aimed to evaluate the antinociceptive effect of the α - and β - amyrin mixture in the cyclophosphamide (400 mg/kg), acetic acid (0,6%, 10mL/kg, i.p.) and mustard oil-induced visceral nociception models in mice and to establish the likely mechanism(s) of action. In the cyclophosphamide-induced visceral pain model, pretreatment of mice with triterpene mixture at the oral doses of 10, 30 and 100 mg/kg significantly reduced ($p < 0.001$) the pain-related behavioral expression time (59,7; 75,5 e 92,3%, respectively, versus the cyclophosphamide-treated group $12,25 \pm 2,98$ min) in a dose-dependent manner. Suppression of visceral pain-related behaviors was also evidenced to the triterpenoid mixture (10 mg/kg) in the intraperitoneal acetic acid- and intracolonicly injected mustard oil-induced test models of visceral nociception 50,4% e 61,1%, respectively compared to the acetic acid-treated group ($42,33 \pm 3,78$ abdominal constrictions/20 min) in the writhing test and to the control in the mustard oil (0,75%, 50 μ L/animal) experiment ($39,28 \pm 3,26$). In these tests, the maximal suppression of visceral pain was observed at 10 mg/kg. The possible mechanisms involved in the antinociceptive action of α - and β - amyrin (10 mg/kg) were analyzed in the mustard oil-induced visceral pain model. In the evaluation of the opioid receptor involvement, both the triterpene mixture and morphine (5 mg/kg, s.c.) effectively inhibited ($p < 0.001$) the number of pain-related behaviors, which could be significantly reversed by pretreatment of animals with an opioid antagonist naloxona (2mg/kg, i.p.), suggesting the opioid participation in the α - and β - amyrin mechanism of action. In the study of the α_2 -adrenoreceptor involvement, the triterpene mixture as well as clonidine (0.1 mg/kg, i.p.), a known α_2 agonist, inhibited ($p < 0.001$) the nociceptive behavioral expression. However, when the animals were pretreated with yohimbine, an α_2 -adrenoreceptor antagonist, only the inhibitory action of clonidine was reversed, suggesting the non-participation of α_2 - adrenoreceptor in the antinociceptive action of α - and β - amyrin. In the evaluation of TRPV1 receptor involvement, mice pretreated with either the α - and β - amyrin, ruthenium red, a TRPV1 non-competitive antagonist, (3 mg/kg, s.c.) or their combination induced a significant and similar inhibition ($p < 0.001$) of the number of nociceptive behaviors. The degree of inhibition with no potentiation or antagonism suggests that α - and β - amyrin may act as a TRPV1 non-competitive antagonist, like ruthenium red. In order to evaluate a possible sedative, motor impairment and motor incoordination effects related to α - and β - amyrin, the pentobarbitone-induced sleeping time, open-field and rota-rod tests were performed, respectively. The data indicated that the treatment of animals with the α - and β - amyrin mixture (10 mg/kg) was unable to cause sedation, motor impairment or motor incoordination effects ($p > 0.05$), being even able to reverse ($p < 0.05$) a mustard

oil-induced motor impairment in the open field test. The results taken together strongly suggest the therapeutic potential of α - and β - amyrin in obliterating visceral nociception through the mechanisms that involve the opioids and TRPV1 receptors.

Key words: Burseraceae, visceral pain, triterpenes, opioid-receptor, TRPV1 receptor.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

O uso de espécies vegetais, com fins de tratamento e cura, remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem despertou para a consciência e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (DI STASI, 1996).

A história da terapêutica começa provavelmente por Mitridates, Século II a.C., sendo ele o primeiro farmacologista experimental. Nessa época, já eram conhecidos os opiáceos, a cila e inúmeras plantas tóxicas. No Papiro de Ebers, de 1550 a.C., descoberto em meados de século passado em Luxor, no Egito, foram mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e veneno de animais (ALMEIDA, 1993).

No Brasil, desde a época dos descobrimentos, os colonizadores observavam e anotavam o uso freqüente de ervas pelos índios (ALZUGARY, 1983)

A partir do século XIX a humanidade se depara diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico, presentes nas plantas medicinais. A descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade farmacológica, muitas vezes já confirmada pelo uso popular e comprovada cientificamente, gera interesses institucionais e governamentais (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

A Biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos (SIMÕES et al., 2002).

Quanto maior o número de espécies, maior potencial de novos medicamentos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996).

As plantas medicinais têm significado um marco na história do desenvolvimento de diversas nações. Alguns países têm tomado consciência do seu potencial em recursos naturais e têm convertido seus esforços em favorecimento de programas de desenvolvimento agrícola e industrial (MIGUEL; MIGUEL, 2000). O Brasil, por exemplo, destaca-se na exportação de itens como o guaraná, cumaru e arruda. No período de 1994 a 1998 foram exportados mais de 4,5 milhões de dólares de guaraná em grão desidratado (ALMEIDA et al., 1998).

Contudo, o potencial dos produtos de origem natural como fonte de novas drogas continua largamente inexplorado uma vez que somente uma pequena fração de plantas, animais e microorganismos tem sido investigada fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

1.2. Nocicepção

1.2.1. Definição de Dor

Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular potencial ou real ou mesmo a nenhuma lesão, embora ainda assim descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido (IASP, 1979).

A dor é uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios do ser humano, conforme sugerem alguns registros gráficos da pré-história, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados para seu controle.

Estudos demonstram que a dor afeta os mais variados domínios da qualidade de vida humana, primariamente físicos e emocionais. O efeito depende da extensão, duração, intensidade, significando que a dor, bem como a doença relacionada, são características individuais (NIV; KREITLER, 2001).

A dor afeta pelo menos 30 % dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. Constitui a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicossociais e econômicas. Muitos dias de trabalho podem ser perdidos por aproximadamente 40% dos indivíduos. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos. A incidência da dor crônica no mundo oscila entre 7 e 40% da população e, como conseqüência da mesma, cerca de 50 a 60% dos que sofrem dela ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida (SBED, 2005).

1.2.2. Classificação dos tipos de dor

A dor pode ser classificada temporalmente em dois grandes grupos: dor aguda (de curta duração, com patologia identificável) e dor crônica (de longa duração, com associação a uma patologia que pode não ser evidente).

A dor também pode ser classificada quanto sua fisiopatologia em (BEERS, 2003):

- Nociceptiva: se os mecanismos de sustentação da dor envolvem lesão tecidual e pode envolver tanto estruturas somáticas como viscerais. Esta última sendo referida em outros locais, sendo pouco localizada;
- Neuropática: é resultante do processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central, como, por exemplo, a dor do membro fantasma e neuralgia pós-herpética;

- Psicogênica: quando existe uma dor persistente com evidências de distúrbios psicológicos sem evidência de uma desordem que poderia causar dor.

1.2.3. Mecanismos da dor

Dor é uma sensação que compreende três mecanismos básicos: **Transdução**, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nódico – mecânico, térmico e químico – em potencial de ação; **Transmissão**, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso, gerado ao nível de nociceptor, seja conduzido para o SNC; e **Modulação**, vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004).

1.2.3.1. Transdução da informação nociceptiva

Os receptores sensoriais de dor são representados por terminações nervosas livres de fibras mielínicas delgadas A δ (tipo III) e fibras nervosas amielínicas C (tipo IV) sendo denominadas como um todo de nociceptores polimodais por apresentar sensibilidade a estímulos mecânicos (espasmo e distensão teciduais), isquêmicos e químicos (bradicinina, íons potássio, prótons, etc.) (NESS; GEBHART, 1990).

Os nociceptores, envolvidos nos mecanismos de **transdução** da dor, são distinguidos por seu relativo alto limiar de ativação, ou seja, eles podem ser ativados por intensos estímulos que são danosos (nódicos) ou potencialmente danosos aos tecidos, mas não por estímulos inócios como o toque (DJOUHRI; LAWSON, 2004). Além dos receptores de alto limiar, destacam-se, também, os receptores com baixo limiar para estímulos naturais, principalmente mecânicos, e respondentes a estimulações de intensidades nódicas ou não (SENGUPTA; GEBHART, 1994).

Mais recentemente foram identificadas estruturas denominadas nociceptores silenciosos, presentes nas terminações periféricas de fibras C de nervos articulares, vísceras, mas não de músculos. Em condições normais

encontram-se “silenciosos”, porém na vigência de processos inflamatórios, estímulos químicos ou térmicos tornam-se responsivos até mesmo àqueles inócuos (PORTO, 2004). Acredita-se que este grupo contribua na sinalização da dor crônica, alterações prolongadas nos reflexos espinhais e regulação autonômica anormal de órgãos internos (CERVERO, 2002).

1.2.3.2. Transmissão da informação nociceptiva

As fibras mielínicas A δ são responsáveis pela rápida transmissão da informação nociceptiva, ou sinais de dor aguda, e as fibras nervosas amielínicas C responsáveis pela transmissão lenta de sinais, que representa a dor em queimação resultante da ativação destas fibras (GUYTON; HALL, 1997).

Periféricamente, as vias aferentes viscerais primárias **transmitem** para a medula o impulso gerado ao nível de nociceptor através de um neurônio pseudo-unipolar, fibras A δ e C, compreendido por um nervo espinhal ou craniano e um gânglio sensitivo anexo a este nervo. Quando provenientes das vísceras, cursam por nervos autonômicos simpáticos (cardíaco médio e inferior, esplânicos maior, menor e médio, esplânicos lombares, etc.) e parassimpáticos (trigêmio, facial, glossofaríngeo, vago e sacrais). Centralmente, os axônios pseudo-unipolares viscerais projetam suas terminações para a medula espinhal ao nível de raiz dorsal (**figura 1**) nas Lâminas de Rexed I, II, V e X (AL-CHAER; TRAUB, 2002).

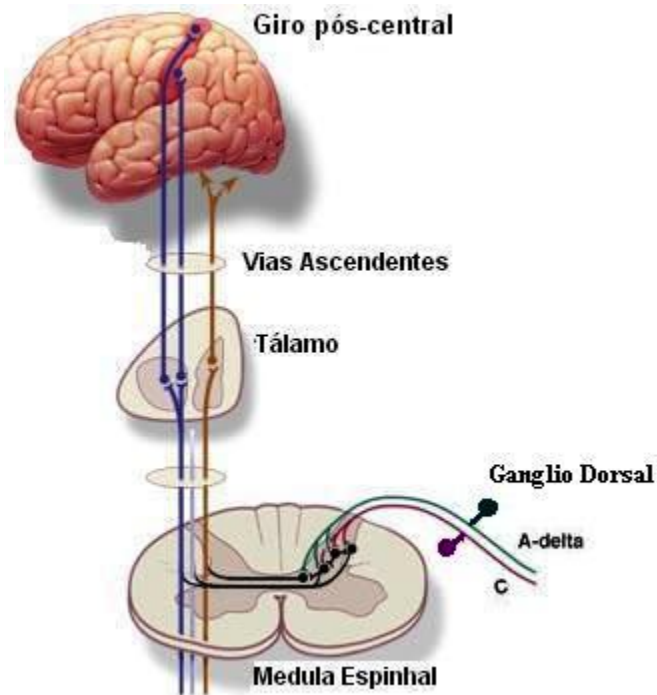


Figura 1 - Representação esquemática dos neurônios das vias ascendentes viscerais e sinapses medulares e talâmicas.

Os neurônios do corno dorsal agrupam-se em duas vias nociceptivas ascendentes secundárias (MACHADO, 1988):

- a) **Vias do grupo lateral:** filogeneticamente mais recentes, representadas pelos tratos neoespinalâmico, neotrigeminalâmico, espinocervicalâmico e sistema pós-sináptico da coluna dorsal, terminando nos núcleos talâmicos (ventral pósterolateral e ventral pósteromedial), porção medial do tálamo posterior e porção posterior do núcleo ventromedial. Nestas regiões talâmicas fazem sinapse com neurônios terciários que se irradiam para o córtex cerebral e determinam o aspecto sensitivo-discriminativo da dor;

- b) **Vias do grupo medial:** filogeneticamente mais antigas. Terminam direta (trato paleoespinotalâmico e paleotrigeminotalâmico) ou indiretamente (trato espinoreticular e espinomesencefálico) nos núcleos mediais e intralaminares do tálamo medial, onde fazem sinapses com neurônios terciários que se irradiam para todo o córtex cerebral participando do aspecto afetivo-motivacional da dor.

1.2.3.3. Modulação da informação nociceptiva

Atualmente, sabe-se que muitas classes de neurônios da coluna dorsal, os próprios neurônios aferentes primários e fibras descendentes do cérebro exercem um grande potencial modulatório sobre a transferência da informação nociceptiva. Após entrar no corno dorsal da medula espinhal, a informação nociceptiva proveniente das vísceras está sujeito ao processamento por uma diversidade de mecanismos, alguns dos quais potencializando (facilitação), outros inibindo sua transferência para centros supra-espinhais (MILLAN, 2002).

Há muitos anos se conhece a possibilidade de controle do ingresso de estímulos nociceptivos desde estruturas centrais. A estimulação elétrica da zona periaquedutal e do núcleo da rafe bulbar, ricos em receptores opióides, provoca analgesia, sem alteração motora, através de uma via inibitória descendente, o fascículo dorso-lateral. Vias descendentes opióides atuam de forma inibitória, revelando um importante papel no alívio da dor. Além de sistemas opióides, também existem sistemas inibitórios descendentes mediados por norepinefrina e serotonina (TORREGROSA, 1994).

Contudo, atualmente se conhece a participação de inúmeros mecanismos envolvidos na modulação inibitória de vias ascendentes, a exemplo agonistas dos receptores D2-dopaminérgicos (GAO et al., 2001), dos receptores 5-HT_{1B} (DURHAM; RUSSO, 1999), dos receptores M₂ e M₄ colinérgicos (MA et al., 2001), dentre outras classes.

1.2.4. Participação de mediadores na dor

Substâncias químicas, denominadas genericamente de substâncias algogênicas, surgem em grandes quantidades nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos, ou isquêmicos. Algumas são de produção local, com a serotonina, bradicinina, histamina, citocinas, produtos derivados do ácido aracdônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, por ativação das vias ciclooxigenases e lipooxigenases. Outras são produzidas antidromicamente (no sentido inverso da transmissão dos nervos sensitivos, isto é, do corpo neuronal para a periferia), sendo as mais importantes a Substância P (SP) e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP). Esse processo de sensibilização local fisiológico é denominado de **hiperalgesia primária**. Essa grande quantidade de mediadores químicos leva à redução do limiar de sensibilidade e aumento da sensibilidade das terminações nervosas vizinhas. É criado um processo de hiperalgesia que se estende progressivamente às regiões não envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial. Os estímulos desencadearão dor generalizada por um estímulo dos nociceptores, que se tornam sensíveis a estímulos de baixa intensidade como, por exemplo, estímulos táteis, levando a uma dor “patológica”. Isso caracteriza a **hiperalgesia secundária** (MARQUES, 2004).

Os mastócitos são derivados de precursores presentes na medula óssea. São conhecidos por participar de processos alérgicos e em reações de hipersensibilidade do tipo I (GALLI, 1993). Os mastócitos também estão associados a muitas condições patológicas em que a dor é o sintoma predominante. A cistite intersticial e a síndrome do intestino irritável são exemplos. Em ambas as condições, um aumento no número de mastócitos tem sido descrito da bexiga e no intestino, respectivamente (BÁRBARA et al., 2004; THEOHARIDES et al., 1998).

A extrema proximidade entre mastócitos e as terminações periféricas dos neurônios sensoriais resulta em uma amplificação bi-direcional em que a SP liberada da terminação nervosa ativa a desgranulação mastocitária, liberando histamina (**Figura 2**). Esta induz uma maior liberação de SP das

terminações sensoriais, além de ativar a liberação de NGF (Fator de Crescimento do Nervo), que exacerba a situação por promover o desenvolvimento e o aumento da função dos neurônios sensoriais (TRACEY; WALKER, 1995).

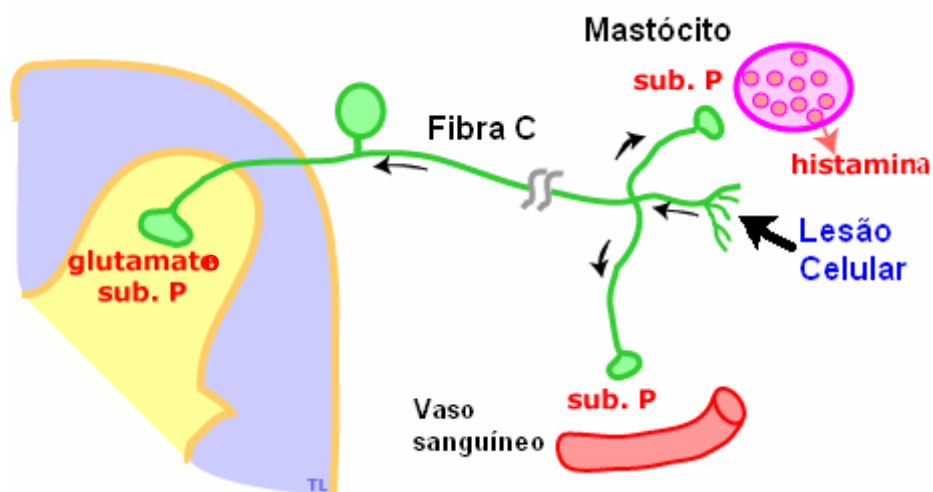


Figura 2 - Reflexo axônico. A liberação de substância P potencializa a inflamação e dor por causar a liberação de histamina e vasodilatação

Em geral demonstra-se que a liberação central e periférica de SP e CGRP ocorre predominantemente de fibras nociceptivas de condução lenta (fibras C), mas a presença destes peptídeos em alguns nociceptores de fibras A δ demonstra que tais neurônios contribuem para sua liberação (MCCARTHY; LAWSON, 1989, 1990).

No soma das fibras secundárias, localizadas no corno dorsal da medula espinhal, receptores NK1 são ativados pela substância P e com isso atuam como facilitadores no processo de transmissão nervosa (MORRIS et al., 2004).

Os receptores NK1 revelam um papel essencial na mediação da resposta nociceptiva central e inflamatória periférica a estímulos nódios, predispondo a uma inflamação neurogênica e modulando respostas aos estímulos mecânicos (LAIRD et al., 2000).

A atividade inflamatória periférica induzida por SP, que atuando em receptores NK-1 medeia uma complexa resposta, consiste em aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, secreção glandular e influxo de células pró-inflamatórias (CATERINA et al., 1997).

A biosíntese e a liberação de substância P pode ser em parte mediada pela ativação do receptor da capsaicina, TRPV1 (receptor vanilóide 1, inicialmente chamado VR1) conhecido por ser um receptor polimodal (estimulado pelo calor, prótons e derivados lipídicos, como a anandamida, Leucotrieno B₄, 12 e 15-HPETE, 5- e 15-HETE). Este induz um influxo de Ca²⁺ nos neurônios sensoriais nociceptivos, resultando na despolarização e liberação de neuropeptídeos proinflamatórios dos terminais de neurônios aferentes (SZALLASI; BLUMBERG, 1999).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* usando diferentes mediadores inflamatórios, como a bradicinina, atuando em receptores B₂ (FERREIRA et al., 2004); ATP extracelular, atuando em receptores P2Y₂ (MORIYAMA et al., 2003); ou NFG, atuando em receptores TrkA (CHUANG et al., 2001) indiretamente são capazes de sensibilizar e estimular o receptor TRPV1.

Essa habilidade de integrar muitos estímulos faz do TRPV1 um alvo adequado para modular a sensibilidade dos nociceptores após lesão tecidual. Camundongos 'knock-out' para o receptor TRPV1 apresentam analgesia para uma variedade de estímulos de dor relacionados a estados inflamatórios, sugerindo que antagonistas destes receptores possam ser efetivos no tratamento de dores associadas com lesão tecidual e exposição a agentes químicos (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000).

Uma prolongada ou uma repetida ativação dos receptores TRPV1 resulta em dessensibilização e insensibilidade a estímulos subseqüentes, tendo este processo um papel importante na regulação da percepção periférica da dor (KOPLAS et al., 1997).

Aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, atuam como neuromediadores nos neurônios aferentes primários, atuando em diferentes receptores glutamatérgicos ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e kainato, além dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, todos com ampla distribuição no SNC (WATKINS; EVANS, 1981).

A ativação destes receptores precipita a produção de segundos mensageiros (cAMP, PKC, fosfatidilinositol, fosfolipase C) para abertura de canais de cálcio e , conseqüentemente, influxo de Ca^{2+} nas células neuronais. Ocorre então produção de outros mediadores (óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico) e ativação de oncogenes (c-fos, muito utilizado como marcador de estresse neuronal), que provavelmente alteram a transmissão do potencial de ação e a ultra-estrutura dos neurônios, suas sinapses, sensibilização medular e fenômeno de '*wind up*'– aumento da duração da resposta de certos neurônios (KRAYCHETE; GUIMARÃES, 2003).

Os receptores NMDA parecem ter uma pequena participação nas respostas nociceptivas evocadas por uma estimulação aguda de estruturas somáticas ou viscerais normais, porém estão envolvidos nas respostas hiperalgésicas após lesão ou inflamação tecidual. Foi demonstrado que antagonistas dos receptores NMDA inibem respostas nociceptivas viscerais, revelando a participação destes receptores na hiperalgesia (OLIVAR; LAIRD, 1999b).

Alguns experimentos, utilizando modelos de nocicepção visceral, demonstram que os receptores NMDA envolvidos no processo de sensibilização central estão localizados ao nível de medula espinhal (MÉEN et al., 2002). Além disso, a SP potencializa a nocicepção induzida pela

estimulação dos receptores de glutamato, existindo evidências de uma ação sinérgica dos dois neurotransmissores na transmissão da dor (MALCANGIO et al., 1998).

1.2.5. Dor Visceral

A dor visceral é uma das mais comuns formas de dor produzidas por um estado patológico (angina, cólica, dispepsia, dismenorréia, etc.) e uma das mais freqüentes razões pela qual um paciente busca auxílio médico.

Apesar disso, a dor visceral tem sido relativamente pouco estudada quando comparada à dor de origem somática, particularmente a dor cutânea. Isso se deve ao difícil acesso das estruturas internas relativamente às superficiais. Contudo, muitos procedimentos técnicos têm surgido para o estudo da dor visceral e um crescente número de artigos explorando este assunto vem sendo publicado no campo clínico e experimental possibilitando um grande progresso nesta área (GIAMBERARDINO, 1999).

A dor visceral resulta da ativação de fibras sensoriais aferentes que inervam órgãos internos e é descrito em termos de cinco características clínicas (CERVERO; LAIRD, 1999):

- 1) Não tem origem em todos os órgãos viscerais, uma vez que nem toda víscera é inervada por receptores sensoriais ou pela falta de um estímulo nóxi apropriado;
- 2) Não está sempre relacionada a uma lesão, e sim às propriedades funcionais e não-estruturais da dor visceral;
- 3) É referida na parede do corpo, o que pode ser explicado pela convergência central das vias viscerais e somáticas;
- 4) É difusa e pouco localizada como consequência da baixa densidade de terminais aferentes periféricos, compensados pela divergência central das vias aferentes;
- 5) É geralmente acompanhada por acentuados reflexos motores e autonômicos, o que é conhecido como reação do sistema de alerta.

Diversos estímulos têm sido empregados no estudo da dor visceral e podem ser categorizados em quatro grupos (NESS, 1999):

- estímulos elétricos: onde eletrodos são implantados nos neurônios que inervam as estruturas viscerais e a estimulação elétrica reproduz estados de dor em humanos, porém a falta de especificidade restringe seu uso;
- estímulos mecânicos: onde a distensão de órgãos ocos usando fluidos ou corpos estranhos permitem a fácil quantificação e controle do estímulo, estando relacionados a estímulos naturais. Como exemplos, citam-se a distensão do sistema biliar e cálculos renais artificiais;
- isquemia: produzida pela oclusão da vasculatura, o que produz estímulos mecânicos, como a oclusão da artéria coronária, sendo dependente de circulação colateral e da atividade metabólica do órgão selecionado;
- estímulos químicos: têm sido aplicados topicamente, por via endovenosa ou por vias fisiológicas, como a administração sistêmica de ciclofosfamida na indução de cistite hemorrágica e a administração intracolônica de óleo de mostarda.

Estes estímulos, quando aplicados a espécies de camundongos transgênicos 'knock-out', ou mutantes (que têm alterações no comportamento nociceptivo devido à destruição de genes específicos codificadores de receptores, neurotransmissores ou de moléculas de segundo mensageiros) têm sido descrito como uma potencial ferramenta para a investigação molecular do processo nociceptivo (CAO et al., 1998; DE FELIPE et al., 1998; SIMONIN et al., 1998). A baixa densidade de inervação do tecido visceral reduz o potencial para mecanismos compensatórios, o que torna válido o uso destes animais (LAIRD, 1999).

1.2.5.1. Modelos para o estudo de dor visceral

Modelos experimentais que reproduzam patologias comuns à realidade clínica são extremamente valiosos, uma vez que permitem a obtenção de conclusões mais relevantes sob este ponto de vista, estabelecendo-se uma interação positiva entre a pesquisa e a prática clínica. Pacientes que apresentam doenças como a cistite hemorrágica e a doença inflamatória intestinal (doença de Crohn e colite ulcerativa) revelam muitas vezes um quadro de dor abdominal (visceral) que muitas vezes não representa as sensações anormais instaladas nestes órgãos, sendo a dor, nestes casos, uma entidade verdadeiramente patológica.

Até pouco tempo, o teste de contorções abdominais representava o único para avaliação do comportamento nociceptivo visceral de animais. O teste requer a injeção intraperitoneal de substâncias algogênicas. Este modelo pode ser considerado víscero-específico quando substâncias que induzem a forte contração da musculatura das vísceras são utilizadas (como a acetilcolina e salina hipertônica). Nestes casos, contudo o tempo total de resposta é muito curto (inferior a 5 minutos) e, portanto, de pouca relevância. Porém, quando substâncias são utilizadas para induzir inflamação e, conseqüentemente, uma resposta mais prolongada, o teste se caracteriza por ser víscero-somático devido ao peritônio ser de estrutura parcialmente somática (LAIRD et al., 2001).

Giamberardino et al. (1995) descreveram um método de cálculo ureteral artificial em ratos. Após um procedimento cirúrgico, uma pedra artificial (resina dental) seria disposta no terço superior dos ureteres. Recuperados da anestesia, os animais seriam observados quanto aos episódios de dor visceral, similares aos do teste de contorções abdominais.

Atualmente, já existem testes capazes de reproduzir um quadro de dor visceral pura, e que não requerem o uso de cirurgias, como o teste de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida e de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda, ácido acético e capsaicina intracolônicos. Estes são testes que permitem avaliar o comportamento nociceptivo de animais somente pela

injeção de substâncias algogênicas e que reproduzirão estímulos característicos nas patologias acima mencionadas, geralmente nocicepção associada ao processo inflamatório.

A ciclofosfamida (CFM) é um agente antitumoral usado na quimioterapia do câncer, cujo efeito colateral, que é dose-limitante, é a cistite hemorrágica. A CFM por si é inerte, seguindo-se uma ativação pelo sistema microsomal hepático, origina-se a mostarda de fosforamida e a acroleína, que são responsáveis pelos efeitos farmacológicos e colaterais, respectivamente. A cistite é resultante do acúmulo do metabólito tóxico na bexiga, excretado pela urina. O dano urotelial resultante é responsável pela dor vesical (COX, 1979).

O óleo de mostarda (Alil-isotiocianato) é um potente ativador neuronal que promove alodinia e hiperalgesia em poucos minutos após aplicação. Induz uma estimulação direta de fibras aferentes sensoriais, além de uma colite rápida, aguda e transitória, além de mudanças na motilidade intestinal e inflamação, o que permite seu estudo como modelo de distúrbios intestinais (KIMBALL et al., 2005).

1.3. Farmacologia dos compostos terpênicos

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo é a representação do conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário (atividades metabólicas essenciais que envolvem aminoácidos, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos) e secundário (envolvendo compostos que não possuem distribuição universal e, portanto, não são necessários a todas as plantas como, por exemplo, alcalóides e flavonóides) (KAUFMAN et al., 1999).

Uma importante classe de metabólitos secundários é representada pelos terpenos, um grupo de compostos naturais com ampla distribuição,

compreendendo mais de 1500 compostos, além de uma variedade estrutural envolvendo mais de 40 tipos de esqueletos básicos (NES; ZHOU, 2001).

São originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno, uma estrutura com cinco átomos de carbono. A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de unidades isopreno: hemiterpenóides, C₅; monoterpenóides, C₁₀ e sesquiterpenóides, C₁₅ (componentes dos óleos essenciais, que contribuem para o aroma das plantas); diterpenóides, C₂₀; triterpenóides, C₃₀; tetraterpenos (ou carotenóides), C₄₀. (VICKERY et al., 1981).

Os terpenos constituem uma família de compostos essenciais ao crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de cada organismo vivo, exercendo diversas atividades biológicas em animais, incluindo humanos. Os terpenos possuem funções essenciais na manutenção da estabilidade da membrana (esteróis), transporte de elétrons (ubiquinona, menaquinona, plastoquinona), glicosilação de proteínas (dolicol), e regulação do desenvolvimento celular (hormônios) (McCASKILL; CROTEAU, 1998).

Muitos terpenos possuem um interesse comercial, incluindo importantes atividades farmacológicas, por exemplo, anti-tumoral (CARNESECCHI et al., 2004), sedativas (do VALE et al., 2002), analgésicas, antiinflamatórias (CARVALHO et al., 1996; IWAMOTO et al., 2001), ativadoras da proteína quinase A (RAJIC et al., 2000), cardioprotetora (LIEBGOTT et al., 2000); bloqueadoras dos canais de cálcio (WANG et al., 2002), antioxidantes (ZHANG et al., 1996), hipolipidêmica (SILVA et al., 2001), antihipertensivas, relaxante da musculatura lisa vascular (TORRES et al., 2000), antimicrobiana (MADUREIRA et al., 2003).

Um importante grupo de terpenos é representado por triterpenos, triterpenos glicosídicos (também conhecidos como saponinas) e outros triterpenóides e seus derivados, os esteróides. É uma família de compostos

com uma grande diversidade estrutural química, porém os principais representantes possuem estrutura tetra e pentacíclicas (PATOČKA, 2003).

Muitos estudos realizados com extratos de plantas contendo triterpenos pentacíclicos, ou o estudo destes compostos isolados, têm revelado uma diversidade de ações farmacológicas, como inibição da PDE4 pelo ácido betulínico (WENIGER et al., 2005), atividade antimicrobiana de *Tricholoma* sp. (OVENDEN et al., 2005) e *Poulsenia armata* (EL-SEEDI, 2005), atividade citotóxica de triterpenos da série lupano (PUAPAIROJ et al., 2005), atividade hepatoprotetora (JEONG et al., 2005) e inibidora da desgranulação mastocitária do ácido ursólico (TSURUGA et al., 1991) hepatoprotetora do ácido oleanólico (KIM et al., 2005) e atividade antiinflamatória de triterpenos de *Boswellia serrata* (AMMON, 2002), do ácido oleanólico (SINGH et al., 1992) e ursólico e lupeol (RECIO et al., 1995).

Apesar de haverem muitos relatos de atividades biológicas relacionadas aos triterpenos pentacíclicos, o atual conhecimento dos efeitos destes e o estudo da relação estrutura-atividade são preliminares, merecendo um aprofundamento (RECIO et al., 1995).

A baixa toxicidade aguda destes compostos naturais e os indícios revelados pelos estudos de relação estrutura-atividade sugerem que substituintes no esqueleto lipofílico de cinco membros destas moléculas podem aumentar a seletividade e a potência para uma determinada ação, indicando que os triterpenos pentacíclicos podem ser um recurso natural de extrema importância para o desenvolvimento de novas drogas (SAFAYHI & SAILER, 1997).

1.4. *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies encontradas na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. Dentre as espécies temos o *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March, uma árvore de grande porte, com

altura que varia de 10 a 20 metros (**Figura 3**), com ocorrência em todo o Brasil, vegetando em terrenos arenosos, tanto úmidos quanto secos. Popularmente é conhecida como almecegueira, breu-branco verdadeiro (Amazônia), almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro bravo (CORRÊA, 1984).

Esta espécie fornece madeira moderadamente pesada (densidade $0,77\text{g/cm}^3$), compacta, dócil ao cepilho, bastante elástica e de grande durabilidade em lugares secos, sendo de excelente qualidade para a construção civil (LORENZI, 1992). Possuindo casca cinzenta, pouco espessa; folhas pinadas, com 2-3 jugos ou raras vezes 4, possuindo de 5 a 9 folíolos oblongos, comumente 7 (daí o nome da espécie) inteiros, glabros, de 10 cm de comprimentos e 5 cm de largura (**Figura 4**); flores verdes amareladas, pequenas e abundantes, dispostas em panículas; fruto com drupa vermelha, de forma ovóide, contendo polpa resinosa e amarela, envolvendo uma semente, ou raras vezes mais de uma, com até quatro (CORRÊA, 1984).

1.4.1. Óleo-resina

Do tronco da espécie *Protium heptaphyllum* March, quando lesionado, exsuda uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas, cujas aplicações gerais são: fabricação de vernizes e tintas, na calafetagem de embarcações, em rituais religiosos, em cosméticos, repelente de insetos e incensar ambientes (**Figura 5**). Em sua forma natural é utilizado na medicina popular como antiinflamatório, gastroprotetor, analgésico, expectorante e cicatrizante de feridas (SIANI et al., 1999). Recentemente, têm-se confirmado alguns desses usos (OLIVEIRA et al., 2004b).

Estudos químicos têm empenhado esforços na caracterização e isolamento de muitos dos constituintes do óleo-resina proveniente de *P. heptaphyllum*. A resina da almécega é constituída por substâncias de natureza terpênica, sendo o óleo essencial rico em monoterpenóides e fenilpropanóides (BANDEIRA et al., 2001; SIANI et al., 1999; ZOGHBI et al., 1995). Entre os constituintes fixos, a literatura registra a presença de um monoterpeno

trioxigenado e quatro misturas binárias de triterpenóides (BANDEIRA et al., 2002; MAIA et al., 2000; SUSSUNAGA et al., 2001), onde se destaca a mistura de α - e β - amirina.

1.4.2. α - e β - amirina

A literatura revela que a mistura dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina (**Figura 6**) já foi identificada em diversas espécies vegetais: *Moldenhawera nutans* (VALE et al., 2005), *Achillea alexandri-regis* (KUNDAKOVIC et al., 2004), *Sideritis candicans Ait* (HERNANDEZ-PEREZ et al., 2004), *Carmona retusa* (VILLASENOR et al., 2004) e que na resina de *Protium heptaphyllum* está presente como constituinte majoritário (VIEIRA-JÚNIOR et al., 2005).

Muitos experimentos demonstraram uma variedade de atividades biológicas para α - e β - amirina, dentre as quais se destacam: atividade antilipoxigenase (KWEIFIO-OKAI et al., 1992), antiartrítica de α -amirina (KWEIFIO-OKAI et al., 1994), antiprurítogênica, possivelmente envolvendo a estabilização de membrana de mastócitos (OLIVEIRA et al., 2004a), gastroprotetora, com possível envolvimento de fibras aferentes sensíveis à capsaicina (OLIVEIRA et al., 2004b), hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2005).

1.5. Relevância e Justificativa

Apesar do recente progresso no desenvolvimento de novas drogas com fins terapêuticos, ainda existe uma continua busca por analgésicos potentes e efetivos, especialmente para o tratamento de dor crônica. Atualmente, uma das mais importantes drogas analgésicas empregadas na prática clínica continua sendo o alcalóide morfina.

Recentemente, muitas substâncias antinociceptivas foram descobertas onde se incluem alcalóides, terpenóides e flavonóides. Uma importante contribuição foi dada pela *Papaver somniferum*, *Salix* sp., *Capsicum* sp. e *Cannabis sativa* no desenvolvimento de novos analgésicos e no conhecimento de complexas vias relacionadas aos mecanismos eletrofisiológicos e moleculares associados à transmissão de dor (CALIXTO et al., 2000).

À mistura dos triterpenos α - e β - amirina tem sido relacionada a uma atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção induzida ácido acético e formalina (OTUKI et al., 2005). Contudo, não existem relatos sobre a eficácia da mistura de α - e β - amirina sobre modelos que simulam a nocicepção visceral humana.



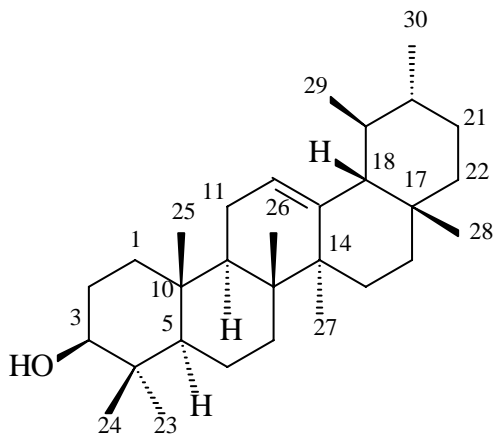
Figura 3 - Fotografia da espécie *Protium heptaphyllum* March



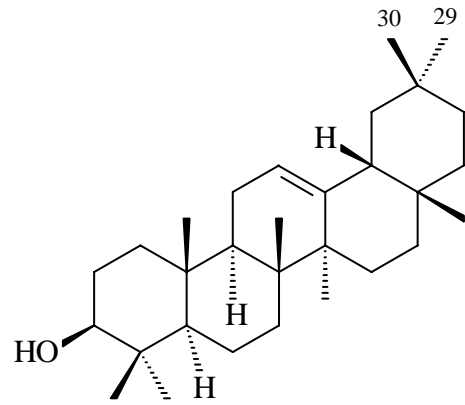
Figura 4 - Fotografia ilustrando folhas e frutos do *Protium heptaphyllum*



Figura 5 - Fotografia ilustrando queima do exsudato óleo-resinoso do *Protium heptaphyllum*



α - amirina



β - amirina

Figura 6 - Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina

Objetivos

2. OBJETIVOS

O *Protium heptaphyllum* March. (Bruseraceae), uma planta medicinal abundantemente encontrada na região Amazônica e Nordeste, produz uma resina rica em triterpenos pentacíclicos, como a mistura binária α - e β - amirina, substâncias que apresentam atividade antiinflamatória, gastroprotetora, antitumoral e antinociceptiva. Uma vez que não existem relatos sobre a atividade da mistura de α - e β - amirina sobre a dor de origem visceral e que esta é uma causa freqüente de busca de auxílio médico, este trabalho tem como **objetivos gerais**:

- ∞ Determinar a atividade antinociceptiva da mistura de triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina em modelos de dor visceral em camundongos.
- ∞ Avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Objetivos específicos:

- ∞ Estabelecer a eficácia da mistura de α - e β - amirina no modelo de nocicepção visceral induzida por ciclofosfamida.
- ∞ Avaliar a atividade da mistura de α - e β - amirina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.
- ∞ Analisar a atividade antinociceptiva da mistura de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda.
- ∞ Avaliar a participação do sistema opióide, do receptor α_2 -adrenérgico e do receptor da capsaicina (TRPV1) no mecanismo antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de nocicepção visceral por óleo de mostarda.
- ∞ Avaliar a atividade da mistura de α - e β - amirina nos modelos de campo aberto, rota rod e tempo de sono por pentobarbital.

Materials

3. MATERIAIS

3.1. Material botânico

A resina de almécega (*Protium heptaphyllum* March) foi adquirida no Mercado Central de Teresina - PI, proveniente de um almecegal existente no município de Timom - MA. A espécie vegetal foi coletada nesse local e identificada no Herbário Graziela Barroso da UFPI e registrada a exsicata com o No 18.247. O material de estudo, a mistura dos triterpenos α - e β - amirina, foi obtida a partir da resina de *P. heptaphyllum*.

3.2. Animais experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno, a temperatura média de $26 \pm 2^\circ$ C em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 18 h antes da realização dos experimentos.

Os protocolos utilizados neste trabalho possuem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.3. Drogas e Reagentes

Produto	Origem
Ácido acético glacial P.A.	Proquímios, Brasil
Ciclofosfamida	Asta Médica, Brasil
Clonidina	Sigma, USA
Clorpromazina	CEME, Brasil
Ioimbina	Sigma, USA
Morfina	Cristália, Brasil
N-acetilcisteína (Fluimucil [®])	Zambon, Brasil
Naloxona	Sigma, Brasil
Óleo de mostarda	Ridel-de Haën, Alemanha
Pentobarbital sódico	Sigma, USA
Tween 80	Sigma, USA
Vaselina	AVD, Brasil
Vermelho de rutênio	Aldrich, USA

3.4. Equipamentos

Equipamento	Origem
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Campo aberto	LPN-CE
Rota Rod	Insight, Brasil

Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α - e β - amirina (extração e fracionamento)

O material vegetal (410 g) foi dissolvido em metanol/diclorometano (4:1), filtrado e o solvente concentrado, obtendo-se 408 g da resina. A resina (12 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (280 g), empacotada com hexano, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 104 frações, de aproximadamente 125 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa de gel de sílica. A fração M-19 (5,43 g), eluída em hexano-AcOEt (9:1), foi submetidas à caracterização, utilizando técnicas espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C -BB 1HD, e DEPT 135°) e de análise térmica (TG e DSC). A metodologia de extração, fracionamento e caracterização dos componentes da fração M-19 (**figura 7**) foram realizados pela Profa. Dra. Mariana Helena Chaves do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

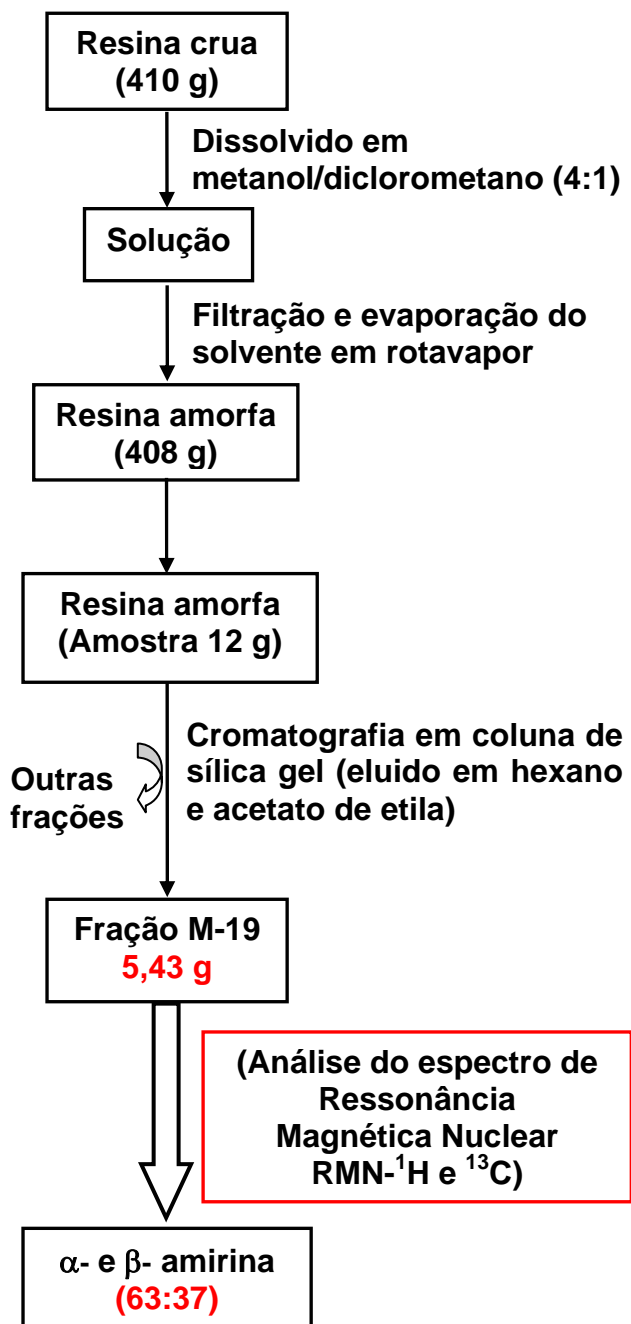


Figura 7 - Processo de isolamento da mistura dos triterpenos α - e β - amirina da resina de *Protium heptaphyllum* March.

4.2. Estudo da atividade antinociceptiva visceral

4.2.1. Dor visceral induzida por ciclofosfamida

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (3, 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.) ou N-acetilcisteína (750 mg/kg, i.p.) 48, 24 e 1,5h antes da injeção de Ciclofosfamida (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a injeção de ciclofosfamida, os animais foram observados por 4 h quanto ao tempo total (em minutos) da expressão dos seguintes comportamentos relacionados à dor visceral: lambar o abdômen, piloereção, arrastar o abdômen contra o solo, contorção e retração abdominais (OLIVAR & LAIRD, 1999a). Um grupo controle normal, que recebeu apenas salina por via intraperitoneal foi incluído no estudo.

4.2.2. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (3, 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.) 1,5 h antes ou morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes de receberem uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% (10 mL/Kg). O número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 min. começados a contar 10 min. após a administração do ácido acético segundo o método de KOSTER et al., 1959.

4.2.3. Dor visceral induzida por óleo de mostarda

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (3, 10, 30 ou 100 mg/kg, v.o.) 1,5 h antes ou Morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes de receberem óleo de mostarda intracolônico (0,75% em salina 0,9%; 50

$\mu\text{L}/\text{animal}$) através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção do óleo de mostarda. Foi utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração. O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retração abdominais) foram contados por 20 min. imediatamente após a instilação de óleo de mostarda (LAIRD et al., 2001). Um grupo controle normal, que recebeu apenas salina por via intracolônica foi incluído no estudo.

4.2.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) 1,5 h antes ou morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes de receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 $\mu\text{L}/\text{animal}$) por via intracolônica através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção do óleo de mostarda. Foi utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração.

O papel do sistema opióide foi avaliado pela administração de naloxona (2 mg/Kg, i.p.) 30 min antes de morfina (5 mg/Kg, s.c.) ou concomitantemente com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.). Após 30 min da administração da morfina e 1,5 h após a administração de α - e β - amirina os animais receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 $\mu\text{L}/\text{animal}$) por via intracolônica.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retração abdominais) foram contados por 20 min. imediatamente após a instilação de óleo de mostarda.

4.2.3.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) 1,5 h antes ou clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) 1 h antes de receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção do óleo de mostarda. Foi utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração.

O papel do sistema adrenérgico foi avaliado pela administração de ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) 30 min antes de clonidina (0,1 mg/Kg, s.c.) ou concomitantemente com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.). Após 30 min da administração da clonidina e 1,5 h após a administração de α - e β - amirina os animais receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retração abdominais) foram contados por 20 min. imediatamente após a instilação de óleo de mostarda.

4.2.3.3. Estudo do envolvimento do receptor da capsaicina (TRPV1)

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) 1,5 h ou vermelho de rutênio (3 mg/Kg, s.c.) (um antagonista não-competitivo do receptor TRPV1 que atua mediante bloqueio do influxo de Ca^{2+} através do canal associado ao receptor) 1 h antes de receberem óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica através de uma fina cânula com ponta arredondada, 1 mm de diâmetro externo. Foram introduzidos 4 cm de comprimento da cânula pela via intracolônica para injeção

do óleo de mostarda. Foi utilizada vaselina sólida na região perianal para evitar estimulação local pela administração.

O envolvimento do receptor TRPV1 foi avaliado pela administração de vermelho de rutênio (3 mg/Kg, s.c.) concomitantemente com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.). Após 1,5 h da administração de α - e β - amirina os animais receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica.

O número total de comportamentos relacionados à dor (lamber abdômen, arrastar-se contra o solo, contorção e retração abdominais) foram contados por 20 min. imediatamente após a instilação de óleo de mostarda.

4.3. Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital

Camundongos foram divididos em grupos de 8 animais e tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg; v.o.), α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) 1,5 h ou clorpromazina (10 mg/kg, i.m.) 1 h antes da injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) como agente indutor de sono (DANDIYA & COLLUMBINE, 1959). Iniciado o período de sono dos animais, estes foram posicionados em decúbito dorsal, registrado o tempo de início do sono (T_i). O momento de retorno à situação de alerta, saída da posição de decúbito dorsal, caracterizou o tempo final do sono (T_f). O período total de observação foi de no máximo 120 min.

O tempo total de sono (TS) foi calculado como a seguir:

$$\mathbf{TS = T_f - T_i}$$

4.4. Teste do Campo Aberto

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto, quadrangular, com 30 cm de lado, tendo em demarcados sua base 9 quadrados iguais de 10 cm de lado. Camundongos foram divididos em 4 grupos de 8 animais: os grupos I e II foram tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg de peso; v.o.) e os grupos III e IV foram tratados com α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.). Após 1,5 h os grupos I e III receberam salina 0,9% por via intracolônica e os grupos II e IV receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica. Após 5 min. os animais foram levados individualmente ao campo aberto, ambientados por 1 min e, em seguida, observados por 4 min. quanto ao número de campos explorados (CAPAZ et al., 1981).

4.5. Teste do rota rod

Camundongos foram pré-selecionados, 24 h antes da realização do experimento, ao serem individualmente posicionados no aparelho de rota-rod (4 rotações por minuto). O animal que permanecia 2 min na barra era selecionado para inclusão no estudo.

Camundongos foram divididos em 4 grupos de 8 animais: os grupos I e II foram tratados com veículo (Tween 80 a 3% em água destilada; 10 mL/Kg de peso; v.o.) e os grupos III e IV foram tratados com α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.). Após 1,5 h os grupos I e III receberam salina 0,9% por via intracolônica, os grupos II e IV receberam óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%; 50 μ L/animal) por via intracolônica. Após 5 min. os animais foram levados individualmente ao rota rod e registrado o tempo de permanência no aparelho durante 2 min (Dunham; Miya, 1957).

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), e o nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de múltipla comparação de Dunnet.

Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menos que 5% ($p < 0,05$).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α - e β - amirina (identificação)

O espectro de RMN ^1H da fração M-19 apresentou um duplo dubleto em δ 3,22 ($J=5$ e 11 Hz), característico de triterpenóides do tipo 3β -OH e dois tripletos em δ 5,15 e 5,20, correspondentes à CH de olefinas. Esta análise foi confirmada pelos espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135°. A comparação dos resultados obtidos com os relatados na literatura permitiu identificar os triterpenóides α -amirina e β -amirina (**Figura 6**), na razão de 63:37, determinada por comparação dos valores da integração dos sinais da região de olefinas (δ 5,15 e 5,20) e do hidrogênio em carbono carbinólico (δ 3,22; H-3), no espectro de RMN ^1H . Considerando-se que foram obtidos, após fracionamento cromatográfico, 5,43 g (45,3%) da mistura de α -amirina e β -amirina, bem como a proporção entre elas, constatou-se que 28,3% (3,43 g) da resina corresponde à α -amirina e 16,6% (2,0 g) à β -amirina (**Figura 7**).

5.2. Estudo da atividade antinociceptiva visceral

5.2.1. Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida

A mistura dos triterpenos α - e β - amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg reduziu significativamente ($p<0,001$), de forma dose-dependente, o tempo total de expressão dos comportamentos de dor visceral pelos animais ($4,93 \pm 0,66$; $3,00 \pm 0,51$; $0,95 \pm 0,12$ min, respectivamente), assim como a N-acetilcisteína ($1,02 \pm 0,18$ min), adotada como controle positivo, quando comparados ao grupo controle ciclofosfamida ($12,25 \pm 2,98$ min). Os animais do grupo controle ciclofosfamida expressaram de forma significativa ($p<0,001$) uma elevação no tempo total de comportamentos de dor quando comparados ao grupo salina ($2,03 \pm 0,38$ min), que recebeu somente salina por via intraperitoneal (**Tabela 1 e Figura 8**).

5.2.2. Efeito de α - e β - amirina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os triterpenos α - e β - amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg e morfina (5 mg/Kg) reduziram significativamente ($p < 0,01$) o número de contorções abdominais expressos pelos animais ($21,00 \pm 2,50$; $27,40 \pm 4,13$; $31,00 \pm 3,50$; $0,14 \pm 0,14$ contorções/20min, respectivamente) quando comparados ao grupo controle ácido acético ($42,33 \pm 3,78$ contorções/20min) **(Tabela 2 e Figura 9)**.

Tabela 1 - Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de expressão dos comportamentos de dor (min.)/4h
Salina	-	2,03 \pm 0,38
Controle ciclofosfamida	-	12,25 \pm 2,98 ^a
α - e β - amirina	3, v.o.	8,76 \pm 1,26
	10, v.o.	4,93 \pm 0,66 ^b
	30, v.o.	3,00 \pm 0,51 ^b
	100, v.o.	0,95 \pm 0,12 ^b
N-acetilcisteína	750, v.o.	1,02 \pm 0,18 ^b

Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo (min) de expressão dos comportamentos de dor durante 4 h após a administração da ciclofosfamida. Veículo (controle), α - e β - amirina e N-acetilcisteína foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (400 mg/kg). O grupo salina recebeu apenas salina por via intraperitoneal. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,001 vs. grupo salina; ^bp<0,001 vs. controle (veículo) (ANOVA e Teste de Dunnet).

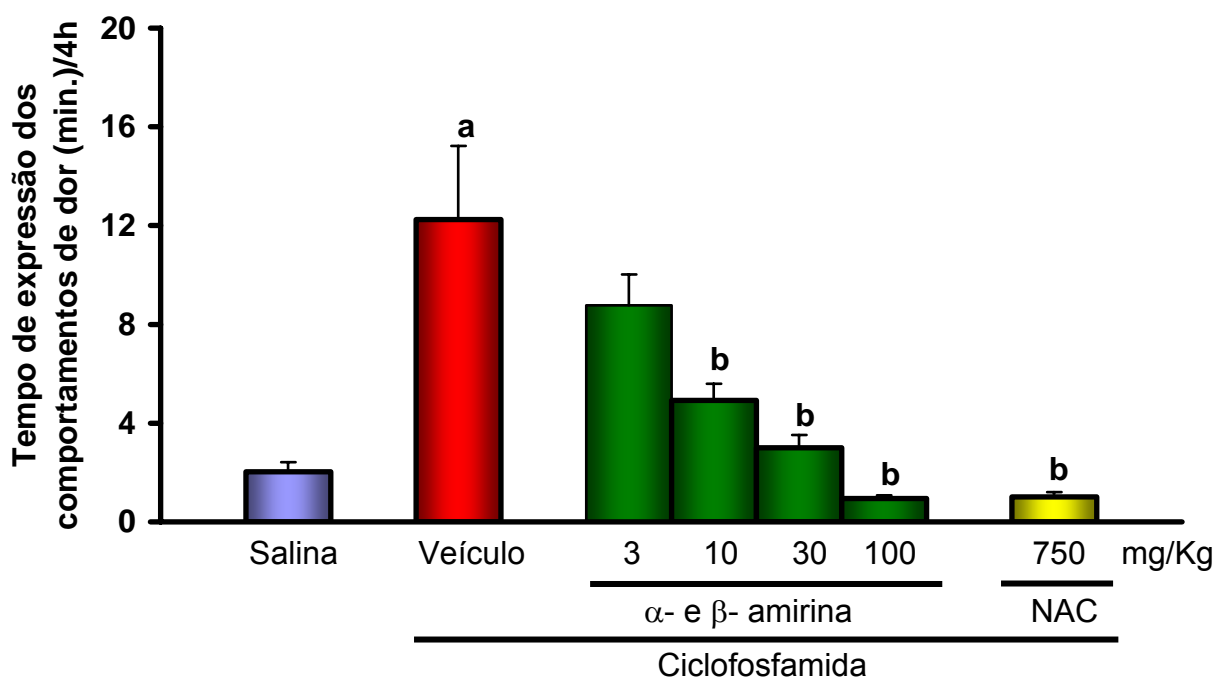


Figura 8. Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de dor Visceral induzida por ciclofosfamida em camundongos. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.), α - e β - amirina (3-100 mg/kg, v.o.) e N-acetilcisteína (NAC, 750 mg/kg, i.p.) foram administrados 48, 24 e 1,5h antes da administração de ciclofosfamida (400 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo (min) de expressão dos comportamentos de dor durante 4 h após a administração da ciclofosfamida. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs. salina; ^b $p < 0,001$ vs. controle ciclofosfamida. (ANOVA e Teste de Dunnet).

Tabela 2 - Efeito de α - e β - amirina no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de contorções abdominais/20min.
Controle ácido acético	-	42,33 \pm 3,78
α - e β - amirina	3, v.o.	41,86 \pm 4,55
	10, v.o.	21,00 \pm 2,50 ^a
	30, v.o.	27,40 \pm 4,13 ^b
	100, v.o.	31,00 \pm 3,50 ^b
Morfina	5, s.c.	0,14 \pm 0,14 ^a

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais exibidas pelos animais durante 20 min, começados a contar 10 min. após a injeção do ácido acético 0,6% (10mL/Kg). Veículo (controle) e α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e morfina 1 h antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,001 e ^bp<0,05 vs. controle ácido acético (ANOVA e Teste de Dunnet).

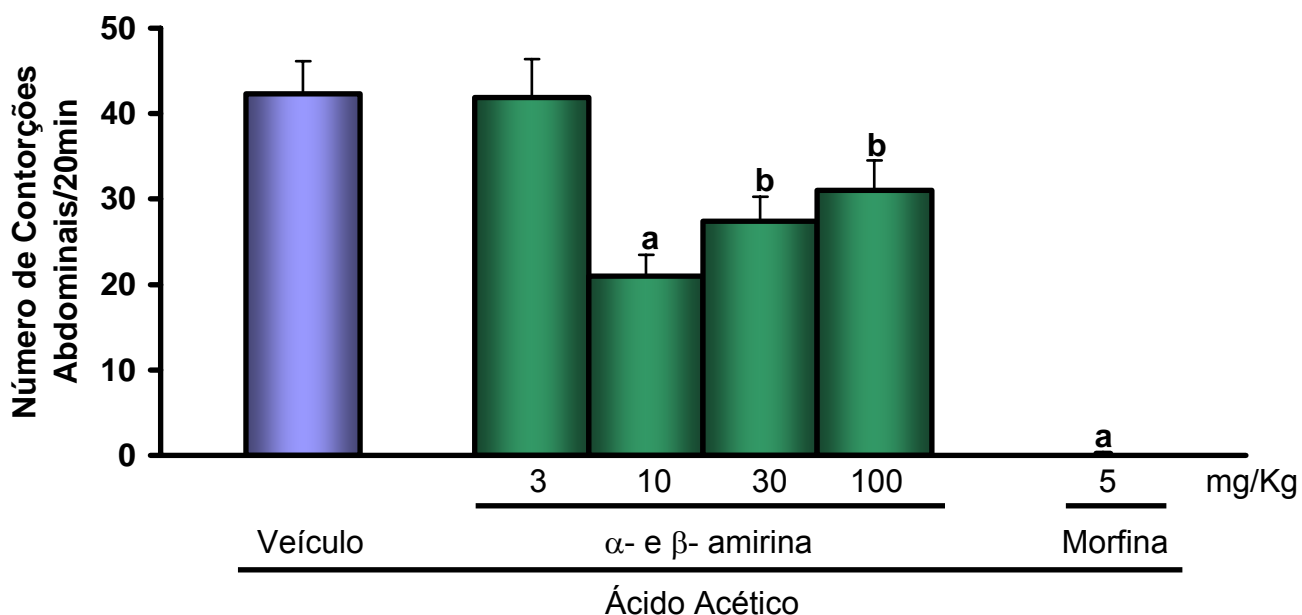


Figura 9. Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (3-100 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes da administração de ácido acético 0,6% (10 mL/Kg, i.p.). Os valores representam a media \pm E.P.M. do número de contorções abdominais exibidas pelos animais durante 20 min, começados a contar 10 min. após a injeção do ácido acético 0,6% (10mL/Kg). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,001 vs. salina; ^bp<0,05 vs. controle ácido acético. (ANOVA e Teste de Dunnet).

5.2.3. Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda

A mistura de α - e β - amirina nas doses de 10, 30 e 100 e a morfina (5 mg/Kg), atuaram reduzindo o número total de comportamentos de dor visceral expressos pelos animais ($15,29 \pm 3,78$; $18,43 \pm 3,77$; $21,57 \pm 3,85$; $2,14 \pm 0,86$, respectivamente) de forma significativa ($p < 0,01$), comparados ao grupo controle óleo de mostarda ($39,28 \pm 3,26$). Este induziu dor visceral caracterizada pela diferença estatística observada ($p < 0,001$) entre este e o grupo salina ($5,42 \pm 2,37$), que recebeu somente salina por via intracolônica **(Tabela 3 e Figura 10)**.

5.2.3.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide

O tratamento dos animais com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.) ou com morfina (5 mg/Kg, s.c.) promoveu uma inibição significativa ($p < 0,001$) do número de comportamentos de dor expressos ($15,29 \pm 3,78$; $2,14 \pm 0,86$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle veículo ($39,28 \pm 3,26$). O pré-tratamento com naloxona (2 mg/Kg, i.p.) reverteu parcialmente ($p < 0,05$) a inibição dos comportamentos nociceptivos da α - e β - amirina ($32,25 \pm 7,74$) e da morfina ($19,38 \pm 6,32$) **(Tabela 4 e Figura 11)**.

Tabela 3 - Efeito de α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20min.
Salina	-	5,42 \pm 2,37
Controle óleo de mostarda	-	39,28 \pm 3,26 ^a
α - e β - amirina	3, v.o.	34,11 \pm 5,11
	10, v.o.	15,29 \pm 3,78 ^b
	30, v.o.	18,43 \pm 3,77 ^c
	100, v.o.	21,57 \pm 3,85 ^c
Morfina	5, s.c.	2,14 \pm 0,86 ^b

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número dos comportamentos de dor durante 20 min após a administração do óleo de mostarda. Veículo (controle) e α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e morfina 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 μ L/animal). O grupo salina recebeu apenas salina por via intracolônica. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,001 vs. grupo salina; ^bp<0,001 e ^cp<0,01 vs. controle óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

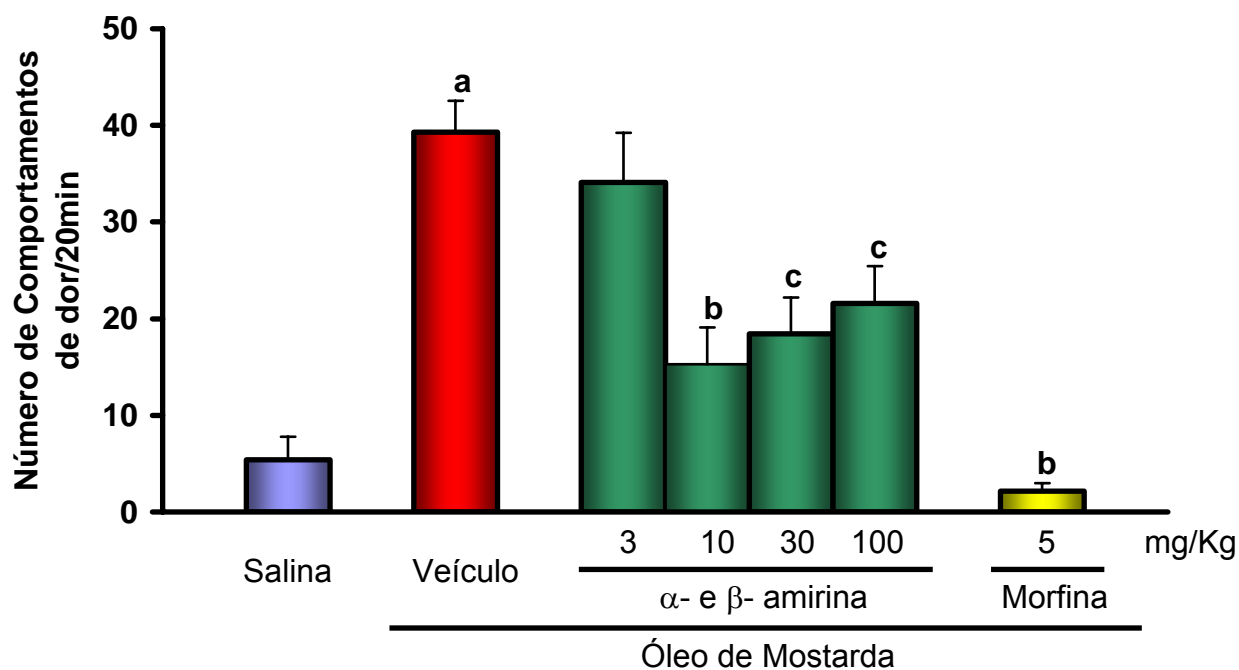


Figura 10 - Efeito antinociceptivo de α - e β - amirina no modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (3-100 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração do óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs. grupo salina; ^b $p < 0,001$ e ^c $p < 0,01$ vs. controle óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

Tabela 4 - Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva de α - e β -amirina e morfina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda intracolônico em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20min.
Controle óleo de mostarda	-	39,28 \pm 3,26
α - e β - amirina	10, v.o.	15,29 \pm 3,78 ^a
Morfina	5, s.c.	2,14 \pm 0,86 ^a
Naloxona + Morfina	2, i.p. + 5, s.c.	19,38 \pm 6,32 ^b
Naloxona + α - e β - amirina	2, i.p. + 10, v.o.	32,25 \pm 7,74 ^c

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número dos comportamentos de dor durante 20 min após a administração do óleo de mostarda. Veículo (controle) e α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e morfina 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 μ L/animal). A naloxona foi administrada 30 min. antes da morfina ou conjuntamente com α - e β - amirina. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,001 vs. grupo controle óleo de mostarda; ^bp<0,05 vc morfina; ^cp<0,05 vs. α - e β - amirina (ANOVA e Teste de Dunnet).

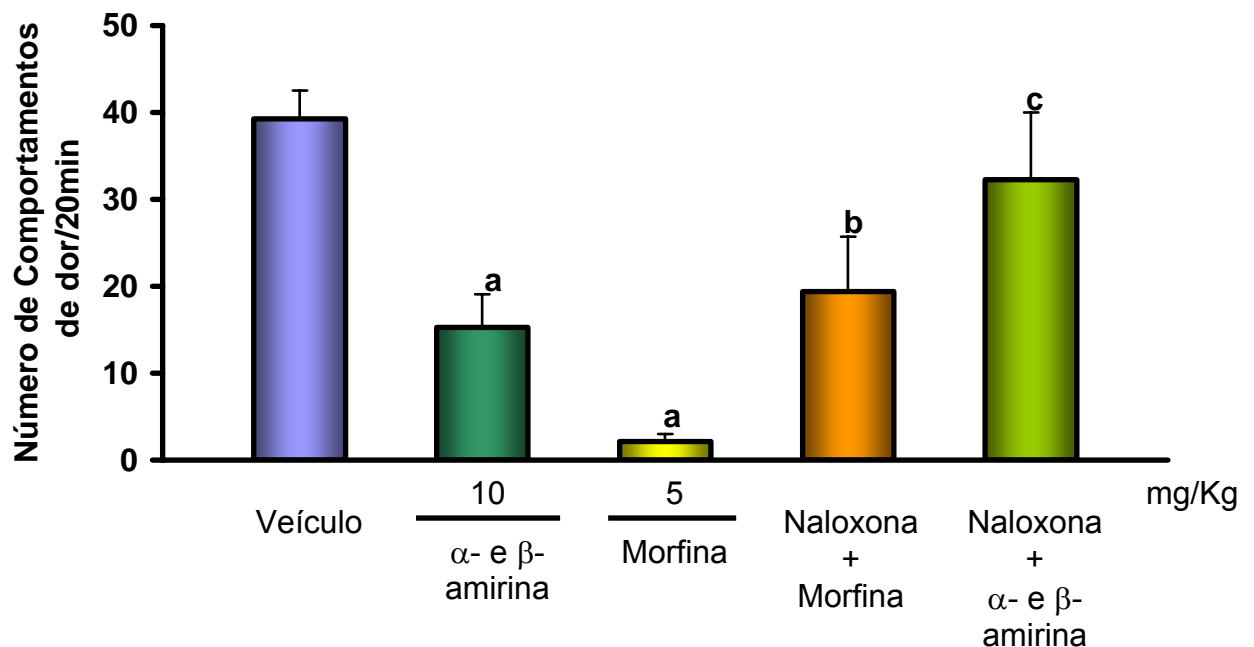


Figura 11 - Estudo do envolvimento do sistema opióide no mecanismo de ação de α - e β - amirina. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e morfina (5 mg/kg, s.c.) 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). A naloxona (2 mg/Kg,i.p.) foi administrada 30 min. antes da morfina ou conjuntamente com α - e β - amirina. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração do óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,001 vs. grupo salina; ^bp<0,05 vs morfina e ^cp<0,05 vs. α - e β - amirina (ANOVA e Teste de Dunnet).

5.2.3.2. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico

O pré-tratamento dos animais com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.) ou com clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) promoveu uma inibição significativa ($p < 0,001$) do número de comportamentos de dor ($26,29 \pm 3,91$; $4,00 \pm 1,90$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle óleo de mostarda ($50,88 \pm 3,69$). O tratamento com ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) reverteu parcialmente ($p < 0,05$) a inibição dos comportamentos nociceptivos da clonidina ($19,75 \pm 4,44$), porém não reverteu a atividade antinociceptiva da α - e β - amirina ($24,80 \pm 2,60$) (**Tabela 5 e Figura 12**).

5.2.3.3. Estudo do envolvimento do receptor da capsaicina (TRPV1)

Os grupos tratados com α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.), vermelho de rutênio (3 mg/Kg, i.p.) e α - e β - amirina + vermelho de rutênio apresentaram uma redução significativa ($p < 0,001$) na expressão do número de comportamentos de dor visceral ($32,20 \pm 2,20$; $32,50 \pm 3,06$; $25,20 \pm 2,01$, respectivamente) quando comparados ao grupo controle óleo de mostarda ($54,60 \pm 2,32$) (**Tabela 6 e Figura 13**).

Tabela 5 - Efeito da ioimbina na antinocicepção de α - e β - amirina e clonidina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20min.
Controle óleo de mostarda	-	50,88 \pm 3,69
α - e β - amirina	10, v.o.	26,29 \pm 3,91 ^a
Clonidina	0,1, i.p.	4,00 \pm 1,90 ^a
Ioimbina +	2, i.p. +	19,75 \pm 4,44 ^{a,b}
Clonidina	0,1, i.p.	
Ioimbina +	2, i.p. +	24,80 \pm 2,60 ^a
α - e β - amirina	10, v.o.	

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número dos comportamentos de dor durante 20 min após a administração do óleo de mostarda. Veículo (controle) e α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e clonidina 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 μ L/animal). A ioimbina foi administrada 30 min. antes da clonidina ou conjuntamente com α - e β - amirina. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,001 vs. controle óleo de mostarda; ^bp<0,05 vs. clonidina (ANOVA e Teste de Dunnet).

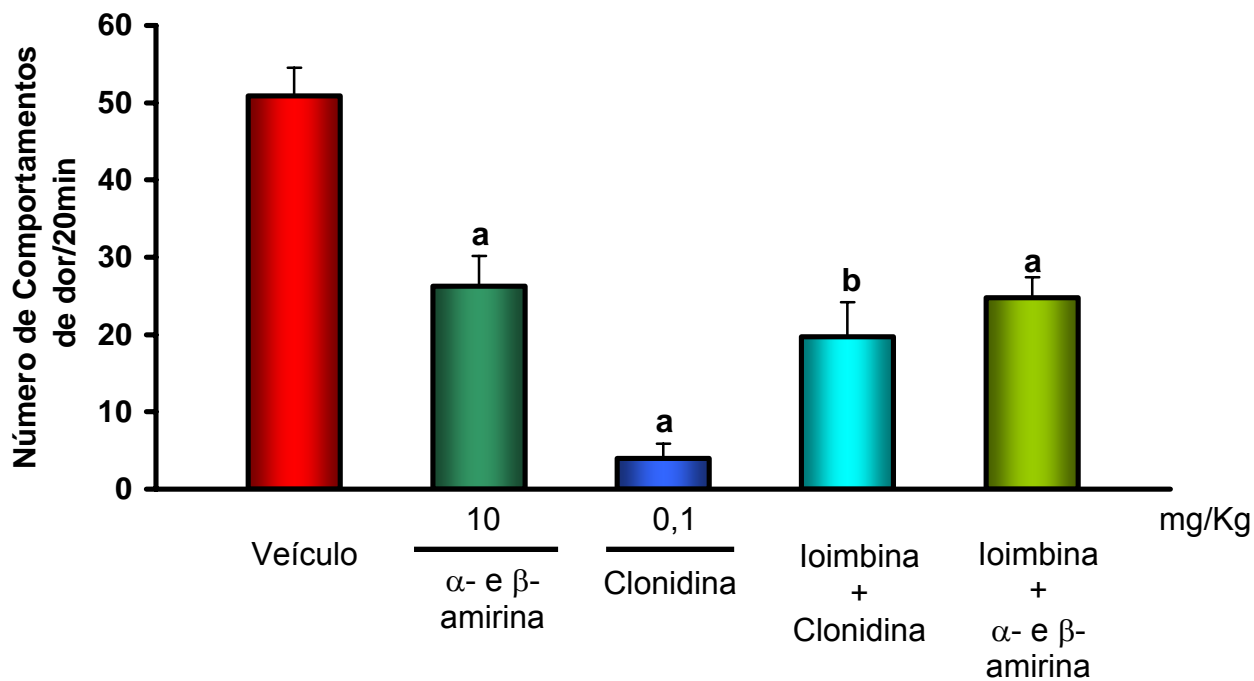


Figura 12. Estudo do envolvimento do sistema adrenérgico no mecanismo de ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). A ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min. antes da clonidina ou conjuntamente com α - e β - amirina. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração do óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^ap<0,001 vs. controle óleo de mostarda; ^bp<0,05 vs. clonidina (ANOVA e Teste de Dunnet).

Tabela 6 - Efeito do vermelho de rutênio sobre a antinocicepção de α - e β -amirina no modelo de dor Visceral induzida por óleo de mostarda em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de comportamentos de dor/20min.
Controle óleo de mostarda	-	54,60 \pm 2,32
α - e β - amirina	10, v.o.	31,20 \pm 2,20 ***
Vermelho de Rutênio	3, i.p.	32,50 \pm 3,06 ***
Vermelho de Rutênio + α - e β - amirina	3, i.p. + 10, v.o.	25,20 \pm 2,01 ***

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número dos comportamentos de dor durante 20 min após a administração do óleo de mostarda. Veículo (controle) e α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e vermelho de rutênio 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina, 50 μ L/animal). O vermelho de rutênio foi administrado conjuntamente com α - e β - amirina. Foram utilizados grupos de 8 animais cada. *** p <0,001 vs. controle óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

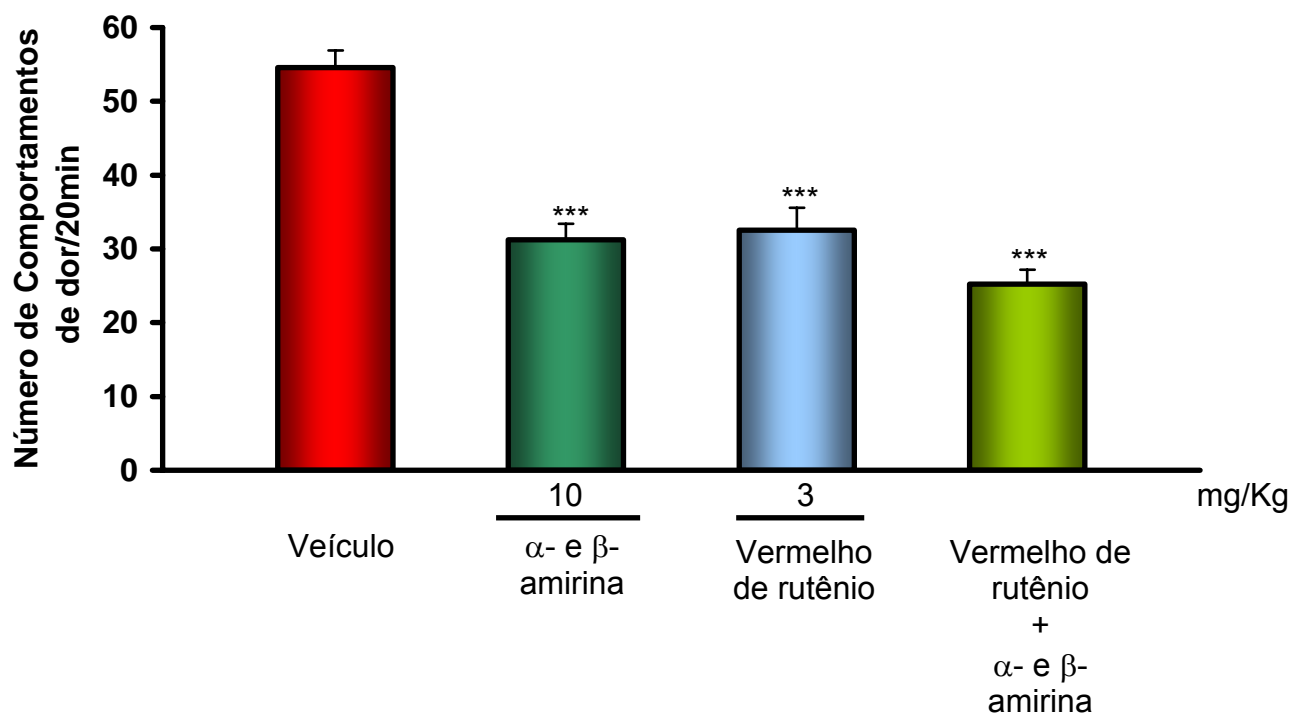


Figura 13 - Estudo do envolvimento do receptor vanilóide no mecanismo de ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e vermelho de rutênio (3 mg/kg, s.c.) 1 h antes da administração intracolônica de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). O vermelho de rutênio (3 mg/Kg, s.c.) foi administrada conjuntamente com α - e β - amirina. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de comportamentos de dor durante 20 min. após a administração do óleo de mostarda. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs. controle óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

5.3. Efeito da α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital

No teste do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, a mistura de α - e β - amirina (10 mg/Kg, v.o.) não potencializou o tempo de sono dos animais ($32,67 \pm 5,61$ min), quando comparado ao grupo controle pentobarbital ($31,67 \pm 4,49$ min). Clorpromazina ($120,00 \pm 0,00$ min) potencializou significativamente ($p < 0,001$) o tempo de sono quando comparado ao controle **(Tabela 7 e Figura 14)**.

5.4. Efeito da α - e β - amirina no teste do campo aberto

Os dados indicam que a mistura de α - e β - amirina, na dose de 10 mg/kg, não interfere com a locomoção espontânea dos animais, quando comparada ao grupo controle veículo ($46,60 \pm 4,43$; $44,20 \pm 3,89$, respectivamente). Porém, o óleo de mostarda inibiu significativamente ($p < 0,05$) a atividade locomotora normal dos animais ($29,20 \pm 2,87$) comparado ao grupo veículo. Os animais tratados com a mistura e que receberam o óleo de mostarda por via intracolônica apresentaram uma reversão ($50,50 \pm 7,44$) significativa ($p < 0,05$) da inibição da atividade locomotora induzida pelo óleo **(Tabela 8 e Figura 15)**.

5.5. Efeito da α - e β - amirina no teste do Rota Rod

Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes da administração intracolônica de salina ou de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Os dados indicam que não houve diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$) entre os grupos veículo, α - e β - amirina, veículo + óleo de mostarda e α - e β - amirina + óleo de mostarda quanto ao tempo de permanência na barra **(Tabela 9 e Figura 16)**.

Tabela 7- Efeito da α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de sono (min.)
Pentobarbital	-	31,67 \pm 4,49
α - e β - amirina	10, v.o.	32,67 \pm 5,61
Clorpromazina	10, i.m.	120,00 \pm 0,00 ***

Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de sono (min.) após a administração do pentobarbital. Veículo (controle), α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes e clorpromazina 1 h antes da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/Kg). Foram utilizados grupos de 8 animais cada. *** $p < 0,001$ vs. controle (veículo) (ANOVA e Teste de Dunnet).

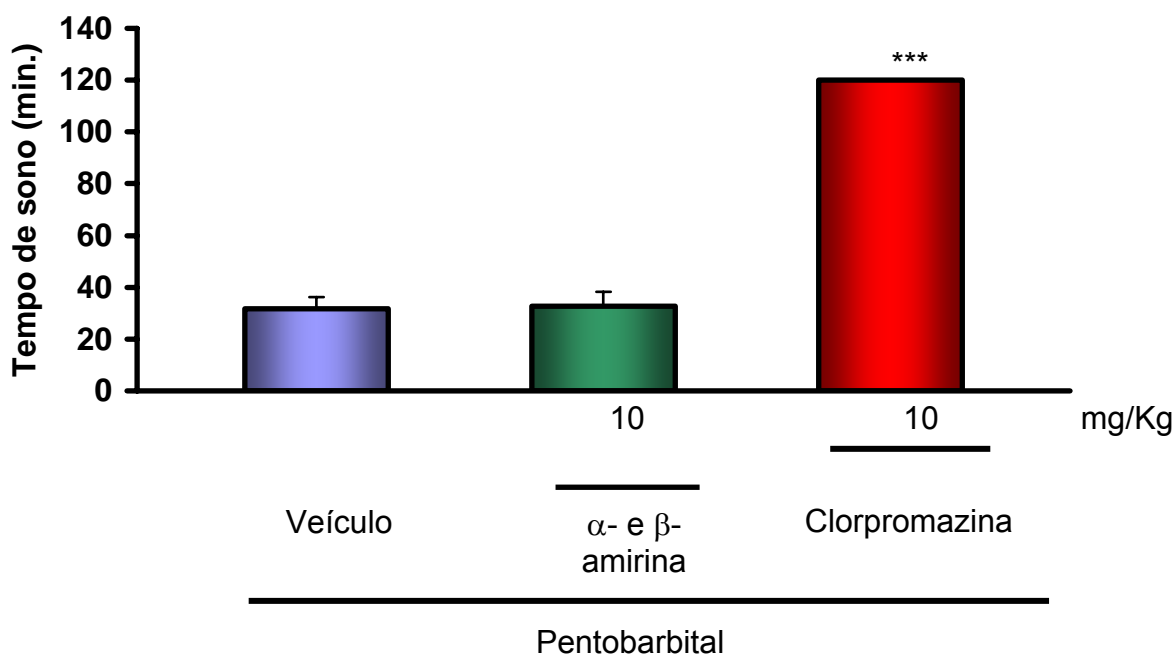


Figura 14. Efeito da mistura de triterpenos α - e β - amirina no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes e clorpromazina (10 mg/kg, i.m.) 1 h antes da administração intraperitoneal de pentobarbital (40 mg/Kg). Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de sono (min.) após a administração do pentobarbital. Foram utilizados 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs. controle (veículo) (ANOVA e Teste de Dunnet).

Tabela 8 - Efeito da α - e β - amirina no teste do campo aberto em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de campos explorados/4min
Veículo	-	44,20 \pm 3,89
α - e β - amirina	10, v.o.	46,60 \pm 4,43
Óleo de Mostarda	-	29,20 \pm 2,87 ^a
α - e β - amirina + Óleo de Mostarda	10, v.o.	50,50 \pm 7,44 ^b

Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de campos explorados no campo aberto durante 4 min. Veículo (controle), α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes da administração intracolônica de salina ou de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Foram utilizados grupos de 8 animais cada. ^ap<0,05 vs. controle (veículo); ^bp<0,05 vs. óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

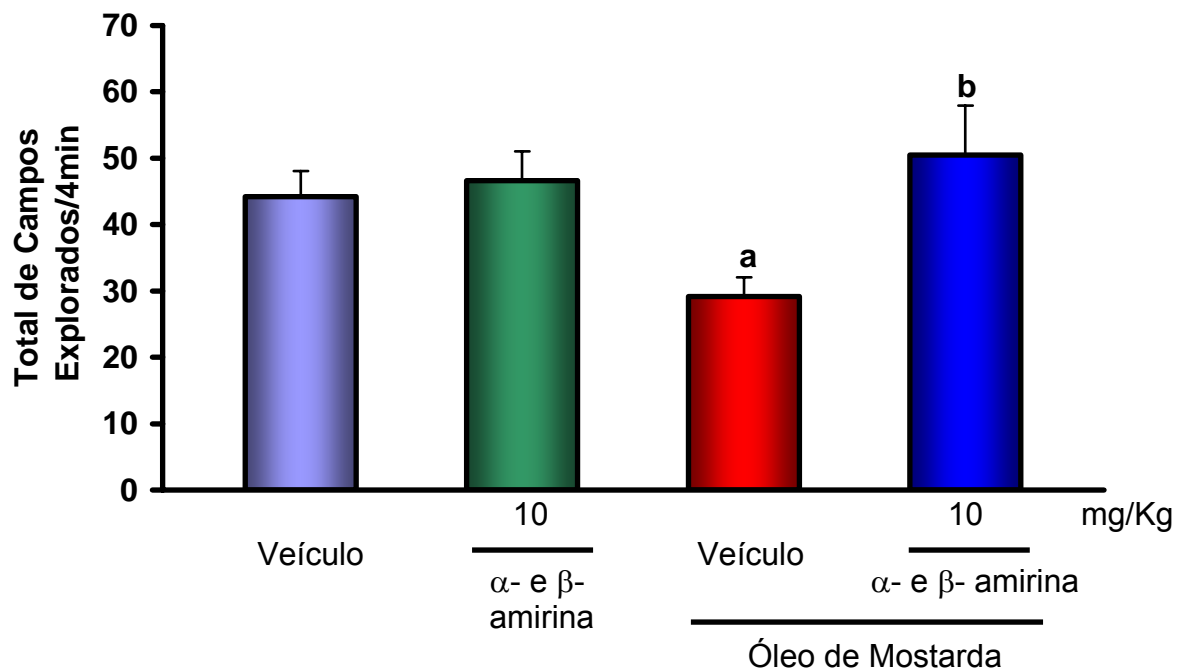


Figura 15. Estudo da ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina no teste do campo aberto em camundongos. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β - amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes da administração intracolônica de salina ou de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de campos explorados no campo aberto durante 4 min. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. controle (veículo); ^b $p < 0,05$ vs. óleo de mostarda (ANOVA e Teste de Dunnet).

Tabela 9 - Efeito da α - e β - amirina no teste do rota rod em camundongos

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de permanência na barra (s.)/2min.
Controle (veículo)	-	120,00 \pm 0,00
α - e β - amirina	10, v.o.	120,00 \pm 0,00
Óleo de Mostarda	-	113,30 \pm 6,67
α - e β - amirina + Óleo de Mostarda	10, v.o.	117,80 \pm 2,17

Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo (s.) de permanência dos animais no aparelho de rota rod durante 2 min. Veículo (controle), α - e β - amirina foram administrados 1,5 h antes da administração intracolônica de salina ou de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Foram utilizados grupos de 8 animais cada (ANOVA e Teste de Dunnet)..

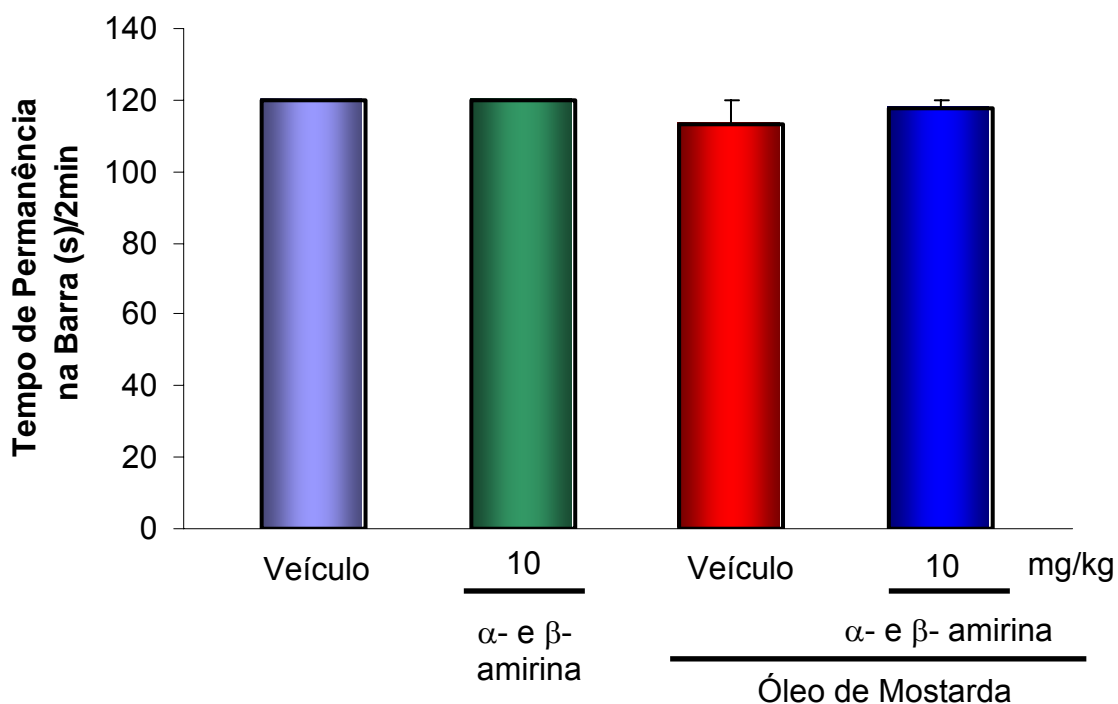


Figura 16. Estudo da ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina no teste do Rota Rod. Veículo (Tween 80 a 3% em água destilada, v.o.) e α - e β -amirina (10 mg/kg, v.o.) foram administrados 1,5 h antes da administração intracolônica de salina ou de óleo de mostarda (0,75% em salina 0,9%, 50 μ L/animal). Os valores representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência dos animais no aparelho de rota rod durante 2 min. Foram utilizados 8 animais por grupo (ANOVA e Teste de Dunnet).

Discussão

6. Discussão

Em animais, muitas substâncias algogênicas, como a capsaicina, óleo de mostarda e ciclofosfamida, quando aplicadas a estruturas viscerais induzem a expressão de comportamentos relacionados à dor envolvendo fibras aferentes sensíveis à capsaicina (JORDT et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2003; MAGGI et al. 1992).

Essas substâncias algogênicas são capazes de induzir dor, bem como uma reação inflamatória, quando fibras aferentes viscerais são sensibilizadas ou neurônios centrais sofrem uma mudança em sua excitabilidade (sensibilização central) após persistente ativação visceral (GEBHART, 1995).

Desconforto e dor são as principais sensações expressas pelas vísceras e ambas aumentam em frequência e intensidade em pacientes com uma desordem funcional. Nociceptores viscerais sensibilizados podem contribuir para estas sensações alteradas. Poucas são as drogas disponíveis para o tratamento da dor de origem visceral.

Estudos anteriores demonstraram uma atividade antipruriginosa para α - e β - amirina em modelos de prurido induzido pelo composto 48/80, envolvendo a estabilização de mastócitos (OLIVEIRA et al., 2004a), além de uma atividade gastroprotetora envolvendo as fibras C sensoriais (OLIVEIRA et al., 2004c). Uma vez que mastócitos e fibras sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina estão envolvidos na etiopatologia da dor visceral (GEBHART, 2000a), estudamos, no presente trabalho, a atividade antinociceptiva da mistura dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina em modelos animais que simulam a dor visceral humana, utilizando óleo de mostarda, ácido acético e ciclofosfamida como indutores.

Desde a introdução da ciclofosfamida como agente terapêutico em 1958, a cistite hemorrágica tem sido reconhecida como uma complicação que limita sua utilização (PHILIPS et al., 1961). Essa patologia é resultado do acúmulo na

bexiga do produto tóxico do metabolismo microsomal hepático da ciclofosfamida, acroleína, responsável pela urotoxicidade (COX, 1979).

Recentemente foi demonstrado que mediadores inflamatórios endógenos como o fator de ativação plaquetária (PAF), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) estão envolvidos na cistite pelo fato de aumentarem a produção do óxido nítrico, um radical livre inorgânico, no tecido alvo (GOMES et al., 1995; LIMA, 1994; OTER et al., 2004; RIBEIRO, 1998; SOUZA-FILHO et al., 1997).

A liberação de substância P de neurônios aferentes primários atua periféricamente estimulando a síntese local do óxido nítrico, o que promove um incremento no dano tecidual na bexiga, precipitando a instalação do processo inflamatório e dor, característicos nesta patologia (ALFIERI et al., 2001).

Uma vez que a formação hepática do metabólito tóxico acroleína contribui para o desenvolvimento do quadro de cistite hemorrágica, tem-se aqui um potencial ponto de controle para o desenvolvimento desta patologia. A mistura de α - e β - amirina demonstrou em estudos anteriores uma atividade inibitória sobre as enzimas citocromo P-450 (OLIVEIRA et al., 2005). Desta forma, foi adotada uma escala de três tratamentos dos animais (48, 24 e 2 h antes da administração da ciclofosfamida), o que seria suficiente para determinar uma inibição efetiva do sistema do citocromo P450.

A N-Acetilcisteína, um composto que atua restabelecendo os níveis celulares de glutatona reduzida, foi utilizado como controle positivo uma vez que a cistite induzida por ciclofosfamida é uma patologia multifatorial, envolvendo a depleção de glutatona por oxidação devido à ação de radicais livres (KRETZSCHMAR, 1996).

No estudo da atividade da α - e β - amirina sobre o modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida, demonstrou-se uma inibição no tempo de expressão dos comportamentos relacionados à dor e que esta ação foi

exercida, pela α - e β - amirina, de forma dose-dependente. Com a dose de 100 mg/kg foi atingida a maior taxa de inibição (92,24%) uma inibição comparável com a do controle positivo utilizado, N-acetilcisteína, que foi de 91,67%.

O teste de contorções abdominais representa uma ferramenta comumente usada pelas indústrias na pesquisa de drogas com potencial analgésico (PORRECA et al., 1987). Porém, muita crítica se faz quanto a especificidade do modelo, uma vez que drogas não-analgésicas, como a atropina (CHERNOV et al., 1967), antidepressivos tricíclicos (TAKAHASHI & PAZ, 1987), antihistamínicos (YEH, 1986) e antihipertensivos (PETTIBONE & MUELLER, 1981) possuem efeito inibitório sobre as contorções.

A injeção intraperitoneal de substâncias algogênicas no modelo de contorções abdominais pode distinguir dois padrões de estimulação. Um considerado víscero-específico, quando substâncias que induzem a forte contração da musculatura das vísceras são utilizadas (como a acetilcolina e salina hipertônica), oferecendo respostas de curta duração (inferior a 5 minutos) e, portanto, de pouca relevância, enquanto a utilização de substâncias para induzir inflamação induz um padrão de resposta mais prolongado, caracterizando uma estimulação víscero-somática, devido ao peritônio ser de estrutura parcialmente somática (LAIRD et al., 2001).

O comportamento de contorções em camundongos é utilizado para avaliar, essencialmente, um potencial analgésico central e periférico de drogas, uma vez que o ácido acético induz algesia pela liberação de substâncias por mastócitos e macrófagos peritoneais, além da sensibilização das terminações sensoriais aferentes periféricas (RIBEIRO et al., 2000).

No teste de contorções abdominais o tratamento via oral dos animais com α - e β - amirina, em doses que variam de 3-100 mg/kg, promoveu uma resposta com maior nível de inibição dos comportamentos obtido com a dose de 10 mg/kg (50,39%) seguido do estabelecimento de um platô na resposta antinociceptiva.

Reichert et al. (2001) demonstraram no teste de contorções abdominais a distinção entre a ação antinociceptiva periférica e central de agentes agonistas opióides.

Morfina, um analgésico opióide de ação central, nos modelos de contorções abdominais e nocicepção pelo óleo de mostarda, inibiu de maneira mais significativa os comportamentos relacionados à dor visceral quando comparado à α - e β - amirina, o que pode sugerir que a ação antinociceptiva da mistura dos triterpenos possa se dar preferencialmente a nível periférico.

Devido ao modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida ser laborioso, requerendo um longo período de observação e o modelo de contorções abdominais não ser víscero-específico, o estudo do mecanismo de ação da mistura dos triterpenos α - e β - amirina ficou restrito ao modelo de dor visceral induzido por óleo de mostarda.

O óleo de mostarda é um potente ativador neuronal que promove alodinia (resposta aumentada a estímulos não-nóxicos) e hiperalgesia (sensibilidade aumentada a estímulos nóxicos) em poucos minutos após aplicação (nocicepção neurogênica). Além disso, ele é capaz de induzir uma colite aguda e transitória (nocicepção não-neurogênica).

O Alil-isotiocianato é o maior constituinte do óleo de mostarda, sendo postulada uma ação sobre receptores da capsaicina TRPV1 como mecanismo de ação, além de desenvolver lesão tecidual direta com produção de mediadores inflamatórios, como a bradicinina e prostaglandinas. Muito se questiona quanto ao real mecanismo pró-nociceptivo desta substância uma vez que camundongos 'knock-out' para o receptor TRPV1 possuem sensibilidade para o óleo de mostarda, sugerindo que a capsaicina, um reconhecido agonista destes receptores, e os isotiocianatos possuem mecanismos moleculares diferentes. Contudo, respostas inflamatórias induzidas por esses agentes irritantes revelam uma dessensibilização cruzada, sugerindo uma convergência entre as vias de sinalização celular (CATERINA et al., 2000).

No modelo do óleo de mostarda o tratamento via oral dos animais com α - e β - amirina, em doses que variam de 3-100 mg/kg, também promoveu a formação de um platô com o aumento da dose, sendo o maior percentual de inibição dos comportamentos obtido com a dose de 10 mg/kg (61,07%). Esta por ser mais efetiva foi, portanto, a dose selecionada para o estudo do mecanismo de ação da mistura de triterpenos.

O padrão de resposta encontrado no modelo de nocicepção por ciclofosfamida comparado ao do modelo de dor por óleo de mostarda e ao de contorções abdominais pode refletir as variações na distribuição das fibras neuronais aferentes primárias e a densidade dos nociceptores ao nível do órgão.

Os resultados revelam o possível envolvimento de receptores opióides como mecanismo de ação de α - e β - amirina. Os dados indicam a efetividade da α - e β - amirina e da morfina quanto à inibição dos comportamentos relacionados à dor visceral (61,07 e 94,55%, respectivamente). A participação da naloxona, um antagonista não seletivo do receptor opióide, reverteu significativamente o efeito antinociceptivo de ambas as drogas, caracterizando a participação deste sistema na modulação inibitória da dor visceral e sugerindo a atividade da mistura dos triterpenos sobre receptores opióides.

Otuki et al. (2004) demonstraram que a atividade antinociceptiva de α - e β - amirina parece não envolver o sistema opióide no modelo de nocicepção por formalina, um modelo de estudo de dor inflamatória de origem somática. Neste estudo, os animais foram pré-tratados com naloxona (um antagonista não seletivo dos receptores opióides, 5 mg/kg, s.c.) 15 min antes da administração da α - e β - amirina (10 mg/kg, i.p.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou salina (solução de NaCl 0,9%, 10 mL/kg, i.p.). Os outros grupos de animais receberam somente α - e β - amirina, morfina ou salina 30 min antes da administração de formalina, segundo o método de VAZ et al (1996). Além disso, a composição da mistura dos triterpenos utilizada diferiu daquela usada em nosso estudo e os modelos de dor utilizados foram diferentes.

Deste modo, torna-se difícil a comparação de nossos resultados experimentais obtidos com a reversão dos efeitos antinociceptivos de α - e β -amirina pela naloxona com os de Otuki e colaboradores (2004) no modelo da formalina, devido às variações na escala de pré-tratamento, na composição dos triterpenóides utilizados bem como pela diferença entre os modelos de dor utilizados.

MANNING & FRANKLING (1998) sugeriram que a substância cinzenta periaquedutal e a área posterior do hipotálamo são os prováveis sítios de ação da morfina no controle da nocicepção no teste da formalina. Porém, existe modulação da dor ao nível periférico tanto no teste da formalina (HONG & ABBOTT, 1995) como em modelos de nocicepção visceral (GEBHART et al., 2000b).

Estudos mais aprofundados devem ser feitos de forma a se caracterizar a participação do sistema opióide como mecanismo de ação da α - e β - amirina na nocicepção de origem somática e visceral.

De forma a determinar em quais outros possíveis sistemas a mistura de triterpenos poderia estar exercendo seu potencial antinociceptivo, avaliamos seu efeito sobre o sistema adrenérgico (envolvimento do receptor α_2) e o envolvimento do receptor da capsaicina TRPV1.

Somado à ação inibitória de vias opióides periféricas e centrais em resposta a estímulos nócicos, destacam-se vias descendentes inibitórias para o controle da dor. O sistema noradrenérgico é considerado uma das maiores vias, originando-se do tronco cerebral para inervar o corno dorsal da medula, controlando a ativação de neurônios nociceptivos (CUI et al., 1999).

A ativação dos receptores α_2 por vias descendentes noradrenérgicas exerce um efeito regulador inibitório importante na modulação da dor aguda e a hiperalgesia inflamatória, possuindo um papel essencial não somente na dor de origem somática, mas também na de origem visceral (MANSIKKA et al., 2004),

atuando via proteína G_i na inibição da enzima adenilato ciclase para aumentar o efluxo celular de K^+ e suprimir as correntes de Ca^{+2} , o que impede a continuidade da liberação de substância P e glutamato pelos terminais nervosos (MILLAN, 2002).

Para avaliação do envolvimento do receptor α_2 adrenérgico, utilizou-se a clonidina, um agonista parcial de todos os subtipos de receptores α_2 . O resultado indica que a clonidina exerce antinocicepção no modelo de dor visceral por óleo de mostarda, inibindo o número de comportamentos relacionados em 92,14%, sendo este percentual revertido parcialmente pela ioimbina, um antagonista destes receptores. Contudo, o efeito inibitório da mistura de α - e β - amirina sobre o comportamento dos animais não foi revertido pela ioimbina, sugerindo a não participação dos receptores α_2 em seu mecanismo de ação.

Os canais associados aos receptores TRP (transient receptor potencial) de mamíferos consistem de seis subfamílias de proteínas conhecidas como TRPV, TRPC, TRPM, TRPP, TRPML e TRPA (CIAPHAM et al., 2003). Estes canais são amplamente distribuídos e estão envolvidos nas percepções de estímulos locais como mudanças na hemodinâmica, pH e osmolaridade. O canal TRPV1, um membro da subfamília TRPV, foi identificado por técnicas de clonagem por expressão usando a capsaicina, um derivado da pimenta vermelha, como ligante. O TRPV1 é referido, portanto, como receptor vanilóide (VR1) ou o receptor da capsaicina (CATERINA et al., 1997).

O receptor da capsaicina (TRPV1) está presente tanto ao nível central (no corno dorsal da medula espinhal) como ao nível periférico, nos terminais dos neurônios sensoriais aferentes exercendo funções integrativas de estímulos químicos e físicos relacionados à dor. O receptor TRPV1 foi caracterizado como um canal iônico não seletivo, que não discrimina cátions mono ou bivalentes, exercendo uma notável preferência pelos últimos, principalmente Ca^{2+} (TOMINAGA et al., 1998).

Esses neurônios aferentes primários sensíveis à capsaicina estão envolvidos não somente com a percepção da dor de origem somática e visceral, mas também possuem funções efetoras sensoriais, onde promovem a liberação dos estoques neuronais de neuropeptídios, substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), através de um mecanismo dependente de Ca^{2+} pela ativação do VR1 (Liddle; Nathan, 2004).

Substâncias de ocorrência natural, especialmente aquelas derivadas de plantas, como capsaicina, resiniferatoxina e mentol, são ferramentas essenciais para a elucidação da biologia molecular e de propriedades farmacológicas de drogas com relevância clínica. Essas substâncias que agem como agonistas dos receptores TRPV1 têm sido usadas clinicamente no tratamento de patologias que envolvem dor. Contudo, agonistas destes receptores estão relacionados com efeitos indesejáveis, sendo os antagonistas uma alternativa promissora (CALIXTO et al., 2005).

O vermelho de rutênio, um antagonista não-competitivo do receptor TRPV1 que atua mediante bloqueio do influxo de Ca^{2+} através do canal associado ao receptor, inibe a atividade excitatória mediada pela capsaicina, além de inibir a liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} por bloquear receptores de rianodina (SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

Para avaliação do envolvimento do receptor TRPV1, como parte do mecanismo de ação da α - e β - amirina no modelo de dor visceral induzida por óleo de mostarda, o vermelho de rutênio foi utilizado. Observou-se uma redução significativa dos comportamentos relacionados à dor na vigência do tratamento com o antagonista vermelho de rutênio e com a mistura α - e β - amirina. O tratamento de animais com ambas as substâncias não revelou alteração significativa no nível de inibição dos comportamentos, se comparado com os tratamentos com α - e β - amirina ou vermelho de rutênio isoladamente. A não potencialização da resposta sugere uma possível ação sobre o mesmo receptor, bloqueio do canal de Ca^{2+} associado ao receptor, para o vermelho de rutênio, e uma possível ação da α - e β - amirina em um sítio alostérico do

TRPV1 ou mesmo um bloqueio de ambos ao nível de canal de Ca^{2+} . A total distinção entre receptores provavelmente resultaria em um sinergismo de atividade.

Em um estudo publicado por Oliveira et al. (2004c), demonstrou-se um efeito gastroprotetor de α - e β - amirina possivelmente pela ativação das fibras sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina, uma vez que a dessensibilização destas fibras, induzida por um excesso de capsaicina, suprime a ação protetora desta mistura de triterpenos.

Porém, em um estado patológico, o que se observa é uma atividade antagonista de α - e β - amirina, evidenciada pela inibição da ativação das fibras aferentes pelo óleo de mostarda.

Uma explicação plausível para este diferente ponto de vista seria baseada na capacidade de estímulo-resposta, ou seja, as propriedades de amplificação da célula controlam o resultado da observação da interação droga-receptor. Isso significa que as propriedades da α - e β - amirina não foram alteradas, apenas a eficiência do sistema de sinalização mudou (GOODMAN; GILMAN, 2003), passando de uma atividade agonista, na vigência de condições normais na gastroproteção, para expressar uma atividade antagonista, na vigência de um estado patológico encontrado na cistite e na colite.

A ação depressora de drogas sobre o sistema nervoso central e o efeito músculo-relaxante não específico, podem reduzir a coordenação motora de animais, como na expressão dos comportamentos de dor (SOJA et al., 2002).

Alguns estudos evidenciaram uma ação sedativa de terpenóides no teste do tempo de sono por pentobarbital (FREIRE et al., 1991; SANTOS & RAO, 2000).

No teste do tempo de sono por pentobarbital, a mistura dos triterpenos não alterou o tempo total de sono dos animais, como evidenciado pela clorpromazina, um conhecido agente sedativo leve, que prolongou de forma significativa o tempo de sono.

Um impedimento locomotor relacionado à injeção de substâncias algogênicas reflete o estado de 'freezing' prolongado dos animais entre os episódios comportamentais de dor. Várias evidências indicam que a dor produz diferentes reações autonômicas e comportamentais, dependendo da sua localização. A dor visceral, por exemplo, causa hipotensão e bradicardia e produz resposta comportamental caracterizada por imobilidade (freezing) e inatenção a estímulos ambientais. Por outro lado, a dor somática superficial e cutânea produz reações completamente diferentes, caracterizadas por hipertensão, taquicardia e ativação comportamental, a clássica resposta de luta e fuga (CAVUN et al., 2004). O teste do campo aberto permite uma fácil observação desta condição.

A performance do teste do campo aberto, revelou uma redução significativa da frequência de locomoção dos animais associada à administração do óleo de mostarda. Porém, o tratamento dos animais com α - e β - amirina antes da injeção intracolônica do óleo reverteu significativamente este impedimento locomotor 'freezing' induzido pelo óleo de mostarda, permitindo afirmar a efetividade desta mistura como droga antinociceptiva.

Complementarmente, o teste do rota rod foi realizado para avaliar uma possível interferência sobre a coordenação motora dos animais causada pela administração do óleo de mostarda ou pelo tratamento com α - e β - amirina.

Os dados indicam que tanto a mistura de triterpenos, como o óleo de mostarda, não induzem incoordenação motora nos animais no teste do rota rod, permitindo afirmar que o 'freezing' expresso pelos animais que receberam o algógeno não se relaciona a alterações motoras e que a mistura de triterpenos é realmente efetiva na reversão desta condição.

A atividade antinociceptiva da mistura dos triterpenos α - e β - amirina nos modelos de nocicepção visceral com o possível envolvimento de receptores opióides e TRPV1 fomenta grandes e importantes perspectivas no uso deste produto de origem natural para o tratamento da dor de origem visceral, uma vez que o tratamento atual se baseia principalmente na inibição de mecanismos inflamatórios com o uso de drogas antiinflamatórias não esteróides.

Conclusões

7. Conclusões

- ∞ A análise por Ressonância Magnética Nuclear da fração M-19 obtida da resina de *Protium heptaphyllum* revelou a presença da mistura dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina;
- ∞ A mistura de α - e β - amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg revelou uma atividade antinociceptiva dose dependente no modelo de dor visceral induzida por ciclofosfamida;
- ∞ No modelo de contorções abdominais por ácido acético e no de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda, a mistura de α - e β - amirina na dose de 10 mg/kg exerceu o maior nível de inibição dos comportamentos relacionados à dor visceral, havendo um declínio da resposta com o aumento da dose (30 e 100 mg/kg);
- ∞ O estudo do mecanismo antinociceptivo da α - e β - amirina indica um envolvimento, em parte, do sistema opióide, como evidenciado pela reversão parcial da atividade da mistura, na dose de 10 mg/kg, proporcionada pela naloxona, um antagonista dos receptores opióides;
- ∞ O uso do antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, ioimbina, não reverteu a atividade antinociceptiva da α - e β - amirina, excluindo-se a participação deste receptor como mecanismo de ação da mistura de triterpenos;
- ∞ O estudo do envolvimento do receptor TRPV1 como parte do mecanismo antinociceptivo de α - e β - amirina revela uma possível ação ao nível deste receptor, evidenciado pela não potencialização da resposta antinociceptiva do vermelho de rutênio, um antagonista não competitivo do receptor TRPV1;
- ∞ A mistura dos triterpenos α - e β - amirina não alterou a atividade locomotora espontânea dos animais, como demonstrado pelo teste do campo aberto; porém na vigência de um estímulo algogênico (injeção intracolônica de óleo de mostarda), que reduz a deambulação normal dos animais, a mistura de triterpenos (10 mg/kg) foi capaz de reverter esse estado de imobilidade, indicando uma atividade antinociceptiva;
- ∞ A atividade antinociceptiva da α - e β - amirina não é resultado de uma ação sedativa, como caracterizado no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital;
- ∞ Tanto a mistura de α - e β - amirina, como o algógeno óleo de mostarda, não causam alterações motoras nos animais, como evidenciado no teste do rota rod, indicando que a atividade antinociceptiva da mistura independe de um comprometimento motor.

Referências Bibliográficas

8. BIBLIOGRAFIA

AI-CHAER, E.D.; TRAUB, R.J. Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain*, v. 96, p.221-225, 2002.

ALFIERI, A.B.; MALAVE, A.; CUBEDDU, L.X. Nitric oxide synthases and cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 363, p. 353-7, 2001.

ALMEIDA, E. R. As plantas medicinais brasileiras. São Paulo: Hemus, 1993. 339p. Disponível em: <http://www.geocities.com/plantas_medicinais/historic.htm> Acesso em: 15 fev. 2005.

ALMEIDA, S.P. de; PROENÇA, C.E.B.; SANO S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina-DF: EMBRAPA, 464 p, 1998.

ALZUGARY, D.; ALZUGARY, C. Plantas que curam, Rio de Janeiro:s.n., v.1, 1983.Disponível em: <http://www.geocities.com/plantas_medicinais/historic.htm>. Acesso em: 15 fev. 2005.

AMMON, H.P. Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases. *Wien Med Wochenschr*, v. 152, p. 373-8, 2002.

BANDEIRA, N.P.; MACHADO, M.I.L.; CAVALCANTI, F.S.; LEMOS, T.L.G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J. Essent. Oil. Res*, v. 13, p. 33, 2001.

BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Protium heptaphyllum* MARCH. *Quim. Nova*, v. 25, p. 1078-1080, 2002.

BARBARA, G.; STANGHELLINI, V.; DE GIORGIO, R.; CREMON, C.; COTTRELL, G.S.; SANTINI, D.; PASQUINELLI, G.; MORSELLI-LABATE, A.M.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; COLLINS, S.M.; CORINALDESI, R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, v. 126, p. 693-702, 2004.

BEERS, M.H. The Merck manual of medical information. Second Home Edition, on-line version, 2003. Disponível em: <<http://www.merck.com/mmhe/index.html>>. Acesso em: 06 maio 2005.

CALABRESE, E.J.; MCCARTHY, M.E.; KENYON, E. The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys*, v. 52, p. 531-541, 1987.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res*, v.14, p. 401-18, 2000.

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, A.E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 106, p. 179-208, 2005.

CAO, Y.Q., MANTHY, P.W.; CARLSON, E.J.; GILLESPIE, E.M.; EPISTEIN, C.J.; BASBAUM, A.I. Primary afferent tachikins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, v. 392, p. 390-394, 1998.

CAPAZ, F.R.; VANCONCELLOS, L.E.; DE MORAES, S.; NETO, J.P. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. v. 251, p. 228-36, 1981.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONCALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSE, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.*, v. 215, p. 53-9, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; SILVA, M.F.C.; MACIEL, M.A.M. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. *Planta Med*, v. 62, p. 402-404, 1996.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, p. 816–824, 1997.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, W.J.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the vanilloid receptor. *Science*, v. 288, p. 306-313, 2000.

CAVUN, S.; GOKTALAY, G.; MILLINGTON, W.R. The hypotension evoked by visceral nociception is mediated by delta opioid receptors in the periaqueductal gray. *Brain Research*, v. 1019, p. 237-245, 2004.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Visceral pain. *Lancet*, v. 353, p. 2145-2148, 1999.

CERVERO, F. Mechanisms of visceral pain. *Pain - An Updated Review*. IASP Press, Seattle, 2002.

CLAPHAM, D.E.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G.; JULIUS, D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Ver*, v. 55, p. 591-596, 2003.

CHERNOV, H.I.; WILSON, D.E.; FOWLER, F.; PLUMMER, A.J. Non-specificity of the mouse writhing test. *Arch Int Pharmacodyn*, v. 167, p. 171-178, 1967.

CHUANG, H. H., PRESCOTT, E. D., KONG, H., SHIELDS, S., JORDT, S. E., BASBAUM, A. I. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*, v. 21, p.957-962, 2001.

CORRÊIA, M. P., Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, p. 82, 1984.

COX, P.J. Cyclophosphamide cystitis: identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol*, v. 28, p. 2045-2049, 1979.

CUI, M.; FENG, Y.; MCADOO, D.J.; WILLIS, W.D. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin and amino acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 289, p. 868-876, 1999.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S.A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A.J.; PUGH, P.L.; ROGERS, D.C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, v. 405, p. 183-187, 2000.

DE FELIPE, C.; HERRERO, J.F.; O'BRIAN, J.A.; PALMER, J.A.; DOYLE, C.A.; SMITH, A.J.H.; LAIRD, J.M.A.; BELMONT, C.; CERVERO, F.; HUNT, S.P. altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the substance P receptor. *Nature*, v. 392, p. 394-397, 1998.

Di STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar/Luiz Cláudio Di Stasi organizador. São Paulo: Editora UNESP, 1996, p. 10.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica do Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 1996, 10p.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S.N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to the other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*, v.46, p. 131-145, 2004.

DO VALE TG, FURTADO EC, SANTOS JG JR, VIANA GS. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. *Phytomedicine*, v. 9, p. 709-714, 2002.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Sci. Ed.*, v. 46, p. 208-209, 1957.

DURHAM, P.L.; RUSSO, A.F. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion by a serotonergic antimigraine drug. *J. Neurosci*, v. 19, p. 3423–3429, 1999.

EL-SEEDI, H.R. Antimicrobial triterpenes from *Poulsenia armata* Miq. *Standl. Nat Prod Res*, v. 19, p.197-202, 2005.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol*, v. 141, p. 787-794, 2004.

FREIRE, S.M.; TORRES, L.M.; ROQUE, N.F.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Analgesic activity of a triterpene isolated from *Scoparia dulcis* L. (Vassourinha). *Mem Inst Oswaldo Cruz*.v. 86, p. 149-51, 1991.

GALLI, S.J. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med*, v. 328, p. 257-265, 1993.

GAO, X.; ZHANG, Y.Q.; WU, G.C. Effects of dopaminergic agents on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration to rats. *Eur. J. Pharmacol*, v.418, p. 73–77, 2001.

GEBHART, G.F. Visceral nociception: consequences, modulation and the future. *Eur J Anaesthesiol*, v. 10, p. 24-27, 1995.

GEBHART GF. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 278, p. 834-838, 2000a.

GEBHART, G.F.; SU, X.; JOSHI, S.; OZAKI, N.; SENGUPTA, J.N. Peripheral opioid modulation of visceral pain. *Ann N Y Acad Sci*, v. 909, p. 41-50, 2000b.

GIAMBERARDINO, M.A.; VALENTE, R.; DE BIGONTINA, P.; VECCHIET, L. Artificial ureteral calculosis in rats: Behavioural characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. *Pain*, v. 61, p. 459-469, 1995.

GIAMBERARDINO, M.A. Recent and forgotten aspects of visceral pain. *European Journal of Pain*, v. 3, p. 77-92, 1999).

GOMES, T.N.; SANTOS, C.C.; SOUZA-FILHO, M.V.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Participation of TNF- α and IL-1 in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Braz J Med Biol Res*, v. 28, p. 1103-1108, 1995.

GOODMAN AND GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Tradução da 10ª edição, Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2003.

GYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HAMBURGER, M; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C.C.; MONTALBETTI-MORENO, Y.; RABANAL, R.M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory

effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. J Ethnopharmacol, v.93, p. 279-84, 2004.

Hong Y, Abbott FV. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. Eur J Pharmacol, v. 277, p. 21-28, 1995.

IASP. International Association for the Study of Pain, 1979. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 2 mar. 2005.

IWAMOTO, M.; OHTSU, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; TANAKA, R. Anti-tumor promoting diterpenes from the stem bark of *Thuya standishii* (Cupressaceae). Bioorganic & Medicinal Chemistry. v 9, p. 1911-1921, 2001.

JEONG, H.G.; KIM, H.G.; HWANG, Y.P. Involvement of cytokines in the hepatic expression of metallothionein by ursolic acid. Toxicol Lett, v. 155, p. 369-76, 2005.

JORDT, J.E.; BAUTISTA, D.; CHUANG, H.H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibers through the TRP channel ANKTM1. Nature, v. 427, p. 260-265, 2004.

KAUFMAN, P.B.; CSEKE, L.J.; WARBER, S.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. Natural Products from Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.

KIM, J.Y.; LEE, K.J.; KIM, D.H.; JEONG, T.C.; LEE, E.S.; CHOI, Y.M.; JEONG, H.G. Cytokine-mediated induction of metallothionein in Hepa-1c1c7 cells by oleanolic acid. Biochem Biophys Res Commun, v. 325, p.792-7, 2004.

KIMBALL, E.S.; PALMER, J.M.; D'ANDREA, M.R.; HORNBY, P.J.; WADE, P.R. Acute colitis induction by oil of mustard results in later development of an IBS-like accelerated upper GI transit in mice Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v. 288, p. 1266-1273, 2005.

KOBAYASHI, Y. The nociceptive and anti-nociceptive effects of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa* in mice. *Planta Med*, v. 69, p. 425-428, 2003.

KOPLAS, P.A.; ROSENBERG, R.L.; OXFORD, G.S. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci*, v. 17, p. 3525–3537, 1997.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*, v. 18, p. 412-417, 1959.

KRAYCHETE, D.C.; GUIMARÃES, A.C. Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 53, p. 833-853, 2003.

KRETZSCHMAR M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*, v. 48, p. 439-446, 1996.

KUNDAKOVIC, T.; FOKIALAKIS, N.; MAGIATIS, P.; KOVACEVIC, N.; CHINOU, I. Triterpenic derivatives of *Achillea alexandri-regis* BORNH. & RUDSKI. *Chem Pharm Bull*, v. 52, p. 1462-5, 2004.

KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A. Antilipoxygenase activity of amyrin triterpenes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, v. 78, p. 367-72, 1992.

KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. Antiarthritic mechanisms of amyrin triterpenes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, v. 85, p.45-55, 1994.

LAIRD, J.M.A. Visceral pain: Where do we go from here? *European Journal of Pain*, v. 3, p. 75-76, 1999.

LAIRD, J.M.A.; OLIVAR, T.; ROZA, C.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.P.; CERVERO, F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a

disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *J Neurosci*, v. 98, p. 345-352, 2000.

LAIRD, J.M.A.; MARTINEZ-CARO, L.; GARCIA-NICAS, E.; CERVERO, F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. *Pain*, v. 92, p. 335-342, 2001.

LIDDLE, R.A.; NATHAN, J.D. Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatology.*, v.4, p. 551-559, 2004.

LIEBGOTT, T.; MIOLLAN, M.; BERCHADSKY, Y.; DRIEU, K.; CULCASI, M.; PIETRI, S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*, v. 95, p. 368-377, 2000.

LIMA, M.V.A. Estudo dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida. Fortaleza, 1994. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 1ª ed. São Paulo: Ed. Plantarum LTDA, 1992, p.76.

MA, H.C.; DOHI, S.; WANG, Y.F.; ISHIZAWA, Y.; YANAGIDATE, F. The antinociceptive and sedative effects of carbachol and oxycodone administered into brainstem pontine reticular formation and spinal subarachnoid space in rats. *Anesth. Analg*, v. 92, p. 1307–1315, 2001.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia funcional. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1988.

MADUREIRA AM, ASCENSO JR, VALDEIRA L, DUARTE A, FRADE JP, FREITAS G, FERREIRA MJ. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Nat Prod Res*, v. 17, p. 375-380, 2003.

MAGGI, C.A.; LECCI, A.; SANTICIOLI, P.; DEL BIANCO, E.; GIULIANI, S. Cyclophosphamide cystitis in rats: involvement of capsaicin-sensitive primary afferents. *Auton Nerv Syst*, v. 38, p. 201-208, 1992.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias. *Quim. Nova*, v. 23, p. 623-625, 2000.

MALCANGIO, M.; FERNANDES, K.; TOMLINSON, D.R. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol*, v. 125, p. 1625-1626, 1998.

MANSIKKA, H.; LAHDESMAKI, J.; SCHEININ, M.; PERTOVAARA, A. Alpha(2A) adrenoceptors contribute to feedback inhibition of capsaicin-induced hyperalgesia. *Anesthesiology*, v. 101, p. 185-190, 2004.

MARQUES, J.O. Dor: diagnóstico e tratamento. *Bases de Anatomia e Fisiopatologia*. São Paulo: Âmbito Editora, v. 1, n.1, abr/mai/jun, 2004.

McCARTHY, PW; LAWSON, SN. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *J Neurosci*, v. 28, p. 745-53, 1989.

McCARTHY, PW; LAWSON, SN. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *J Neurosci*, v. 34, p. 623-32, 1990.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends in Biotechnology*, v.16, p. 349-355, 1998.

MÉEN, M.; COUDORÉ-CIVIALE, M.A.; PARRY, L.; ESCHALIER, A.; BOUCHER, M. Involvement of N-Methyl-D-Aspartate receptors in nociception in

the cyclophosphamide-induced vesical pain model in conscious rat. *European Journal of Pain*, v. 6, p. 307-314, 2002.

MELZACK, R., WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, v. 150, p. 971–979, 1965.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. *Desenvolvimento de Fitoterápicos*. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v. 66, p. 355-474, 2002.

MORIYAMA, T.; LIDA, T.; KOBAYASHI, K.; HIGASHI, T.; FUKUOKA, T.; TSUMURA, H. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci*, v. 9, p. 6058-6062, 2003.

MORRIS, R.; CHEUNSUANG, O.; STEWART, A.; MAXWELL, D. Spinal dorsal horn neurone target for nociceptive primary afferents: do single neurone morphological characteristics suggests how nociceptive information is processed at the spinal level. *Brain Res Rev*, v.46, p.173-190, 2004.

NES, W.D.; ZHOU, W. Terpenoids: Higher, 2001. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, London: Nature Publishing Group, Disponível em: <<http://www.els.net>>.

NESS, T.J. Models of visceral nociception. *ILAR Journal*, v. 40, 1999.

NESS, T.J.; GEBHART, G.F. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*, v. 41, p. 167-234, 1990.

NIV, D.; KREITLER, S. Pain and Quality of Life. *Pain Practice*, v. 1, p.150-161, 2001.

OLIVAR, T.; LAIRD, J.M.A. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflammation. *European Journal of Pain*, v. 3, p. 141-149, 1999a.

OLIVAR, T.; LAIRD, J.M.A. Differential effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockage on nociceptive somatic and visceral reflexes. *Pain*, v. 79, p. 67-73, 1999b.

OLIVEIRA, F.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 78, p. 719-25, 2004a.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and antiinflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, v.49, p. 105-111, 2004b.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β - amirin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Planta Med*, v. 70, p. 1-3, 2004c.

OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Ethnopharmacol*, v. 98, p. 103-108, 2005.

OTER, S.; KORKMAZ, A.; OZTAS, E.; YILDIRIM, I.; TOPAL, T.; BILGIC, H. Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition in Cyclophosphamide induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. *Urological Research*, v. 32, p. 185-9, 2004.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, v.313, p. 310-318, 2004.

OVENDEN, S.P.; YU, J.; BERNAYS, J.; WAN, S.S.; CHRISTOPHIDIS, L.J.; SBERNA, G.; TAIT, R.M.; WILDMAN, H.G.; LEBELLER, D.; PLATEL, D.; MAY, T.W.; MEURER-GRIMES, B.M. Trichomycins A and B: antibacterial triterpenes from the new species *Tricholoma* sp. AU1. *J Nat Prod*, v. 68, p. 409-12, 2005.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 1, p. 7 – 12, 2003.

PETTIBONE, D.J.; MUELLER, G.P. Alpha adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. *Endocrinology*, v. 109, p. 789-802, 1981.

PHILIPS, F.S.; STERNBERG, S.S.; CRONIN, A.P.; VIDAL, P.M. Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity. *Cancer Res*, v. 21, p. 1577-1589, 1961.

PORRECA, F.; MOSBERG, H.I.; OMNAAS, J.R.; BURKS, T.F.; COWAN, A. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 240, p. 890-894, 1987.

PORTO, C.C. Exame Clínico: Bases para a Prática Médica. 5^a ed, Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2004, p. 37-40.

PUAPAIROJ, P.; NAENGCHOMNONG, W.; KIJJOA, A.; PINTO, M.M.; PEDRO, M.; NASCIMENTO, M.S.; SILVA, A.M.; HERZ, W. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Med*, v. 71, p. 208-13, 2005.

RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, D.S.; POLYA, G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med*, v. 66, p. 206-210, 2000.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; RIOS, J.L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.*, v. 61, p. 182-185, 1995.

REICHERT, J.A.; DAUGHTERS, R.S.; RIVARD, R.; SIMONE, D.A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain*, v. 89, p. 221-227, 2001.

RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SANTOS, C.C. Involvement of nitric oxide and TNF α in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced cystitis. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 17, Italy, 1998. Proceedings, p. 227-231.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.C. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 387, p. 111-118, 2000.

SAFAYHI, H.; SAILER, E.R. Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenos. *Planta Med*, v. 63, p. 487-493, 1997.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res.*, v. 14, p. 240-244, 2000.

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2005. Disponível em: <www.dor.org.br/dor_impactos.asp>. Acesso em: 20 mai. 2005.

SENGUPTA, J.N.; GEBHART, G.F. Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. *J Neurophysiol*, v. 71, p. 2046-2060, 1994.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; DE LIMA, M.O.; SANTOS, R.; FERREIRA, F.E.; SOARES, E.C. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*, v. 66, p. 57-69, 1999.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; RAO, V.S. Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in mice. *Planta Med.* v. 67, p. 1-3, 2001.

SIMÕES, O.C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia. Da planta ao medicamento.* Porto Alegre/Florianópolis. Editora UFSC/ Editora UFRGS, 2002, 833p.

SIMONIN, F.; VALVERDE, O.; SMADJA, C.; SLOWE, S.; KITCHEN, I.; DIERICH, A.; LE MEUR, M.; ROQUES, B.P.; MALDONADO, R.; KIEFFER, B.R. Disruption of the kappa-opioid receptor gene enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of selective kappa-opioid agonist U-50, 488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J*, v. 17, p. 191-202, 1998.

SINGH, G.B.; SINGH, S.; BANI, S.; GUPTA, B.D.; BANERJEE, S.K. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*, v. 44, p. 456-458, 1992.

SOJA, P.J.; TAEPAVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B.E.; MCERLANE, S.A.; FRAGOSO, M.C. Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. *Anesthesiology*, v. 97, p. 1178-1188, 2002.

SOUZA-FILHO, M.V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Am J Pathol*, v. 150, p. 247-256, 1997.

SUSSUNAGA, G.S.; SIANI, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 709-711, 2001.

SZALLASI, A., BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, v. 51, p. 159-212, 1999.

TAKAHASHI, R.N.; PAZ, M.M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.20, p. 607-610, 1987.

THEOHARIDES, T.C.; PANG, X.; LETOURNEAU, R.; SANT, G.R. Interstitial cystitis: a neuroimmunoendocrine disorder. *Ann N Y Acad Sci*, v. 840, p. 619-634, 1998.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, Sep, v. 21, p. 531-543, 1998.

TORREGROSA, S. Mecanismos y vias del dolor. *Boletin de la Escuela de Medicina*. v.23, 1994.

TORRES, L.M.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, v. 55, p. 617-619, 2000.

TRACEY, D.J.; WALKER, J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res*, v. 44, p. 407–411, 1995.

VALE, A.E.; DAVID, J.M.; BRANDAO, H.N.; DAVID, J.P. A new flavonol glycoside derivative from leaves of *Moldenhawera nutans*. *Z Naturforsch*, V. 60, p. 45-9, 2005.

VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 278, p. 304-312, 1996.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. Secondary Plant Metabolism. The Macmillan Press Ltd., Hong Kong, 1981.

VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quim. Nova*, v. 28, p. 183-187, 2005.

VILLASENOR, I.M.; CANLAS, A.P.; FAUSTINO, K.M.; PLANA, K.G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *J Ethnopharmacol*, v. 92, p. 53-6, 2004.

YEH, S.Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripenlenamine in the rat. *J Pharmacol. Exp. Ther*, v. 35, p. 683-701, 1980.

WANG, G.J.; WU, X.C.; LIN, Y.L.; REN, J.; SHUM, A.Y.; WU, Y.Y.; CHEN, C.F. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, v. 445, p. 239-245, 2002.

WATKINS, J.C.; EVANS, R.H. Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol*, v. 21, p. 165-204, 1981.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B.H.; VONTHRON-SENECHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N.J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytother Res*, v. 19, p. 75-7, 2005.

ZHANG, C.F.; WANG, D.S.; LING, X.Z. Diacetylmethystoidin A protects isolated working rat heart against myocard reperfusion injury. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 17, p. 245-248, 1996.

ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S.; LUZ, A.I.R.; Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J. Essent. Oil. Res.*, v. 7, p. 541, 1995.