



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE β -AMIRINA, UM TRITERPENOS
PENTACICLÍCO ISOLADO DE *Protium heptaphyllum* March. EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DOR.**

CINTHYA IAMILLE FRITZ BRANDÃO DE OLIVEIRA

FORTALEZA-CE

2010

CINTHYA IAMILLE FRITZ BRANDÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE β -AMIRINA, UM TRITERPENO
PENTACICLÍCO ISOLADO DE *Protium heptaphyllum* March. EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DOR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a):

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

FORTALEZA

2010

CINTHYA IAMILLE FRITZ BRANDÃO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE β -AMIRINA, UM TRITERPENO
PENTACICLÍCO ISOLADO DE *Protium heptaphyllum* March. EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE DOR.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (UFC)
(Orientador)

Prof.^a. Dr.^a. Mirlane Guimarães de Melo Cardoso (UFAM)

Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou (UECE)

Prof.^a. Dr.^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (UFC)

Prof. Dr. Sérgio Araújo Holanda Pinto (UFC)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

À D. Nazinha;

Mãe e instrutora, que mesmo com o pouco estudo e todas as dificuldades financeiras e pessoais que a vida lhe ofertou, insistiu comigo e minha irmã, em nossa formação profissional e pessoal e, mesmo com as condições que possuía, me fez ser a pessoa que sou e chegar até este momento;

À Carlos Augusto, querido esposo e parceiro, e nossas filhas muito amadas, Iamile, Ana Maria e Sophia:

Que juntos construímos uma família capaz de superar os mais difíceis momentos e, que descobri que o prazer de estar com vocês é o maior presente que já recebi nesta vida.

Toda a minha gratidão e amor.

*“A aprendizagem é um simples apêndice de nós mesmos; onde quer que estejamos,
está também nossa aprendizagem.”*

William Shakespeare

À Deus:

Pai e criador, pela oportunidade da vida e de toda sorte e infortúnios, que me fizeram perceber quão valioso é viver.

À Jesus e seu Santo Espírito:

pela oportunidade de conhecê-lo, amá-lo e reconhecê-lo, a cada dia, nas criaturas e na criação de Deus.

À Maria Santíssima,

mãe, intercessora e alento em todos os meus momentos.

“A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna suficiente o que temos. Transforma negação em aceitação, caos em ordem, confusão em clareza. Pode transformar uma refeição num banquete, uma casa num lar, um estranho num amigo.”

Melody Beattie

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao, pela paciente orientação sempre presente e oportuna, amizade, ética e dignidade, tanto científica quanto humana, um grande exemplo para levar pela vida a fora;

À Universidade Federal do Amazonas, por autorizar meu afastamento, por acreditar na formação de seus docentes e incentivar nosso constante crescimento profissional;

À meus pares do Departamento de Ciências Fisiológicas, e em especial aos professores de farmacologia Frederico Arruda e Mirlane Cardoso e ao técnico Francisco Martins (*in memorium*), pela confiança, apoio e amizade, que tornam nosso ambiente de trabalho um dos meus lugares preferidos;

Aos membros avaliadores da banca de doutorado, professores Dra. Mirlane, Dr. Saad, Dra. Nylane e Dr. Sérgio, por sua disponibilidade e valiosa contribuição na avaliação deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia/UFC e seus professores, que tanto contribuíram com minha formação;

À professora Flávia Almeida Santos, pela contribuição dada sempre que solicitada e pelo carinho dedicado a mim e minha família;

Pela parceria, amizade e contínua colaboração aos colegas pós-graduandos do LPN, que fizeram estes 4 anos entrarem no rol dos melhores de minha vida acadêmica: Alana Fonteneles, Ana Carla Carvalho, Caroline Mourão, Célio Melo, Danilo, Deive Campos, Iana Calou, Julyanne Frota, Karine, Marjorie Guedes, Natália Bitú, Otacílio Jr., Roberto César, Sérgio Holanda, Silvéria Regina, Talita Cavalcante, Tiago Olinda;

Aos bolsistas do LPN, que sempre solícitos auxiliaram na parte experimental: Tiago Melo, Patrícia Lima, Saulo Ribeiro, Daniel Souza, Anyssia Miranda, Carla Bezerra, João Carlos;

Às técnicas do LPN: D. Marta Braga, pelo grande carinho e orações sempre iluminados e oportunos; D. Nísia Rodrigues pela torcida na reta final da caminhada;

Aos funcionários: Aura e Márcia (pela disposição nas mais variadas situações); Fernando, Alana, Chiquinho e Iris; Sr. Carlos (pela disponibilidade e alto astral); Sr. Haroldo;

Às grandes amigadas que o estado do Ceará proporcionou: Ana Carla Carvalho, Cecília, Dayse Wong, José Roberto, Juliane, Karine, Kristiana Mousinho, Marjorie Guedes, Otacílio Jr., Roberta Dalcico, Roberto César, Silvéria Lira e Talita Cavalcante: que emprestaram seus ouvidos, coração, alegria e compartilharam suas experiências para meu crescimento pessoal e profissional e sua generosidade e apreço pela minha família marcaram nossa etapa de vida aqui;

Aquelas que não só abriram seu apartamento para mim, mais também me receberam no coração: Marne, Silvéria e Kristiana. O que fizeram por mim e por minha família não será esquecido;

Ao meu pai Roberto, por todo carinho, colaboração e apoio que, dentro de suas limitações, foram extremamente importantes, em toda minha vida e, minha irmã, Sissy, pela torcida, força, colaboração, parceria e até pelas brigas de toda uma vida: o convívio com você foi mais que necessário para ser quem sou;

Às amigas eternas: Cynthia Tereza Silva e Marcélia Célio Lopes, não há palavras entre nós, pois conhecemos o coração uma da outra!

Aos familiares e amigos do Amazonas, pela torcida, ajuda e oração, sempre necessárias;

À FAPEAM, pelo apoio financeiro.

Resumo

Estudo da atividade antinoceptiva de β -amirina, um triterpeno pentacíclico isolado de *Protium heptaphyllum* March. em modelos experimentais de dor. CINTHYA IAMILLE FRITZ BRANDÃO DE OLIVEIRA. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Depto. Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Os efeitos dos triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina, isolados a partir da resina de *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae), foram testados preliminarmente em modelos de nocicepção oral, sendo que β -amirina apresentou significantes efeitos antinociceptivos, norteando a pesquisa com este isolado na investigação de seus efeitos em modelos de dor orofacial induzida por capsaicina ou formalina e na dor induzida por capsaicina na córnea de camundongos; na dor térmica (testes de imersão de cauda em água quente e placa quente); e na nocicepção visceral induzida por ácido acético 0,6%. Camundongos Swiss machos ($n = 8$ / grupo) foram pré-tratados com β -amirina (10, 30 e 100 mg / kg, v.o.), morfina (5 mg / kg, s.c.) ou controle (água destilada + 0,05% de Tween 80, v.o.), uma hora antes de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g) ou formalina (20 μ L/animal) serem administradas na vibrissa direita. β -amirina também foi avaliada em teste comportamental relacionado à dor, desta vez por aplicação tópica de capsaicina na conjuntiva do camundongo ("eye wiping test"). Neste teste foi medido o tempo, em segundos, que o animal passou "limpando" o olho durante um período de 10 minutos. O triterpenóide demonstrou principalmente um efeito antinociceptivo dose-independente em todos os modelos de nocicepção testados. Na dor orofacial induzida por capsaicina, β -amirina (30 e 100 mg/kg) e morfina foram mais eficazes na redução da resposta nociceptiva. Nestas doses, as reduções foram de 81 e 90% para β -amirina e 97% para morfina, respectivamente. No modelo de dor orofacial, a nocicepção produzida pela capsaicina é acompanhada por um aumento na resposta térmica localizada (que foi mensurada por termometria), e reduzida significativamente pelo pré-tratamento dos animais com β -amirina ou L-NAME, um inibidor da NOS. Em animais diabéticos, a capsaicina injetada na vibrissa promoveu um menor grau de nocicepção orofacial comparada com os não-diabéticos. No teste da formalina, morfina e β -amirina apresentaram antinocicepção significativa reversível nas duas fases por naloxona. No entanto, β -amirina (30 mg/kg) inibiu a segunda fase com maior eficiência. Os valores de DE_{50} para β -amirina e morfina foram 16,44 mg/kg (LC 10,0-38,41) e 3 mg/kg (LC 2,5-5,0) na primeira fase e 43,37 mg/kg (LC 30,52-39,30) e 3 mg/kg (LC 2,5-5,0) na segunda fase, respectivamente. A co-administração de β -amirina e morfina, em seus respectivos níveis de dose de DE_{50} , não apresentou qualquer efeito aditivo ou potencializador antinociceptivo. No entanto, as combinações das doses DE_{25} e $DE_{12,5}$ apresentaram uma antinocicepção comparável ao efeito combinado da DE_{50} , sugerindo que através da utilização de β -amirina, a dose analgésica de morfina poderia ser minimizada para evitar a sua alta dose e os efeitos colaterais associados. β -amirina também foi eficaz em aumentar o limiar de dor térmica no teste da imersão da cauda (mais não no teste placa quente) e, na redução das contorções induzidas por ácido acético. A antinocicepção produzida por β -amirina, foi significativamente bloqueada em animais pré-tratados com os respectivos antagonistas vermelho de rutênio (2 mg/kg, s.c.) e naloxona (1 mg/kg, i.p.), indicando o envolvimento de receptores da capsaicina (TRPV1) e opióides em seu mecanismo. No teste da formalina, de forma similar à morfina, β -amirina bloqueou significativamente a inibição da ingestão alimentar associada a dor. Assim como morfina, β -amirina apresentou ação inibitória sobre o trânsito intestinal, efeito esse revertido pelo pré-tratamento com antagonista opióide não seletivo, naloxona. Estes dados sugerem que β -amirina apresenta um potencial antinociceptivo comparável à analgesia periférica produzida pela morfina, evidenciando a exploração desta para o desenvolvimento de um analgésico não-opiáceo útil na farmacoterapia de patologias do trigêmeo e visceral.

Palavras-chave: β -amirina; triterpeno pentacíclico; dor orofacial; dor ocular; neuropatia diabética; antinocicepção.

Abstract

Studies on the antinociceptive activity of β -amyrin, a pentacyclic triterpene isolated from *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) in experimental models of pain.
CINTHYA IAMILLE FRITZ BRANDÃO DE OLIVEIRA. Oriented by Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Doctoral Thesis. Pos-Graduate Program in Pharmacology. Depto. Physiology and Pharmacology of Ceará Federal University.

The effects of pentacyclic triterpene α -amyrin and β -amyrin, isolated from resin of *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae), were preliminarily showed significant tested in models of nociception oral, and antinociceptives effects, guiding the search with this isolate in the investigation of their effects in models of orofacial pain induced by capsaicin or formalin and against capsaicin-induced corneal pain; thermal pain (tail immersion test in hot water and hot-plate) and in acetic acid 0,6%-induced visceral nociception in mice. Male Swiss mice ($n = 8$ per group) were pre-treated with β -Amyrin (10, 30, and 100 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, s.c.) or vehicle (distilled water + 0,05% Tween 80), one hour before the capsaicin (20 μ l, 1.5 μ g) or formalin (20 μ l, 1.5%) injection into the right vibrissa. β -Amyrin was also assessed on pain-related behavioral test (Eye-wiping) by topical application of capsaicin (20 μ l, 1.5 μ g) on to the mouse conjunctiva and the time (sec) that the animal spent in eye wiping was determined during a 10 min period. The triterpenoid demonstrated mostly a dose-unrelated antinociception in all the test models of nociception. Against the orofacial pain induced by capsaicin, β -Amyrin (30 e 100 mg/kg, p.o.) and morphine showed greater potency in reducing the nociceptive response. At the doses employed, the reductions were 81 and 90% to β -Amyrin and 97% for the morphine, respectively. Capsaicin nociception in orofacial test is accompanied by a localized thermal flare (measured by thermometry), which was significantly diminished by pretreatment of animals with β -Amyrin or L-NAME, an NOS inhibitor. In four weeks diabetic mice, capsaicin injected into vibrissa pad demonstrated a lesser degree of orofacial nociception compared to non-diabetics. In formalin test, both morphine and β -Amyrin showed significant naloxone reversible antinociception in both phases. However, β -Amyrin inhibited the second phase response, more prominently, at 30 mg/kg. The calculated ED_{50} values for β -Amyrin and morphine were 16,44 mg/kg (CL 10,0 - 38,41) and 3 mg/kg (CL 2,5 - 5,0) in the first phase and 43,37 mg/kg (CL 30,52 - 39,30) and 3 mg/kg (CL 2,5 - 5,0) in the second phase, respectively. Co-administration of β -Amyrin and morphine at their respective ED_{50} dose levels failed to demonstrate any additive or potentiating effect on anti-nociception. However, at ED_{25} and $ED_{12.5}$ dose-combinations exhibited an antinociception that equalled their ED_{50} combination effect, suggesting that by the use of β -Amyrin, the analgesic dose of morphine could be minimised to avoid its high-dose-associated side-effects. Similar to morphine, β -Amyrin significantly blocked the pain-related suppression of food intake in formalin test. β -Amyrin (30 and 100 mg/kg was also effective in increasing the thermal pain threshold in hot-water tail immersion test (but not in hot-plate test), and in reducing the acetic acid-induced writhes. The antinociception produced by 30 mg/kg β -Amyrin was significantly blocked in animals pre-treated with the respective antagonists capsazepine (5 mg/kg, s.c.), and naloxone (1 mg kg/kg, i.p.), indicating the involvement of capsaicin (TRPV1) and opioid receptors in its mechanism. Like morphine, β -Amyrin showed an inhibitory effect on intestinal transit, an effect reversed by pretreatment with nonselective opióide antagonist, naloxona. These data indicate that β -Amyrin has the antinociceptive potential comparable to peripheral analgesia produced by morphine that could be explored further on its suitability in developing a non-opioid analgesic useful in pharmacotherapy of trigeminal and visceral pathologies.

Keywords: β -amyrin; pentacyclic triterpene; orofacial pain; corneal pain; diabetic neuropathy; antinociception.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vibrissa de camundongo.	30
Figura 2. Espécie adulta de <i>Protium heptaphyllum</i> March.	48
Figura 3. Galho com folhas e frutos de <i>Protium heptaphyllum</i> March.	48
Figura 4. Queima do exsudato óleo-resinoso de <i>Protium heptaphyllum</i> March.	48
Figura 5. Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos α -Amirina (à esquerda) e β - amirina (à direita).	49
Figura 6. Fluxograma de isolamento do triterpeno β -amirina da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> March.	60
Figura 7. Posição do animal para a captação de imagem com Câmera de infravermelho T360 (Flir Systems).	65
Figura 8. Efeito de β -Amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.	77
Figura 9. Participação de receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -Amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em camundongos.	78
Figura 10. Participação de receptores opióides na ação antinoceptiva de β -Amirina utilizando modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.	79
Figura 11. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de receptores TRPV1.	83
Figura 12. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de mecanismo opióide.	85
Figura 13. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de Óxido Nítrico.	87
Figura 14. Estudo da ação de β -Amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.	89
Figura 15. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -Amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.	90
Figura 16. Participação dos receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -Amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.	91
Figura 17. Efeito de β -Amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: Participação de receptores opióides.	93
Figura 18. Efeito de β -Amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: Participação de receptores TRPV1.	94
Figura 19. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos diabéticos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de TRPV.	97
Figura 20. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos diabéticos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de Óxido Nítrico.	99
Figura 21. Avaliação da variação de doses de Morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina.	105
Figura 22. Avaliação do efeito de β -Amirina no modelo de dor orofacial	107

induzida por formalina, em camundongos.

Figura 23. Avaliação do efeito de β -Amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: Análise de efeito cumulativo da associação de β -Amirina e Morfina e Participação dos receptores opióides.	108
Figura 24. Média diária do consumo de alimento em camundongos submetidos à dor orofacial induzida por formalina, em um período de 5 dias.	110
Figura 25. Efeito de β -Amirina no trânsito intestinal, com carvão ativado, em camundongos: participação de receptores opióides.	112
Figura 26. Efeito de β -Amirina na dor visceral induzida por ácido acético.	114
Figura 27. Efeito de β -Amirina na dor visceral induzida por ácido acético: participação dos receptores opióides.	115
Figura 28. Efeito de β -Amirina na dor visceral induzida por ácido acético: participação dos receptores TRPV1.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de α -amirina e de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos	76
Tabela 2. Participação de receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.	Apêndice
Tabela 3. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -Amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.	Apêndice
Tabela 4. Estudo do efeito de β -Amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: papel dos receptores TRPV1.	82
Tabela 5. Estudo do efeito de β -amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: papel dos receptores opióides.	84
Tabela 6. Estudo do efeito de β -amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: participação da via do óxido nítrico.	86
Tabela 7. Estudo da ação de β -amirina no modelo de dor ocular induzida por capsaicina em camundongos.	Apêndice
Tabela 8. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.	Apêndice
Tabela 9. Participação dos receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.	Apêndice
Tabela 10. Efeito de β -amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: participação de receptores opióides.	Apêndice
Tabela 11. Análise da variação de temperatura local, em °C por termometria, no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos: Participação de receptores TRPV1.	96
Tabela 12. Análise da variação de temperatura local, em °C por termometria, no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos: participação da via do óxido nítrico.	98
Tabela 13. Efeito de β -amirina no modelo de dor pela imersão da cauda, em camundongos diabéticos: participação de receptores opióides.	101
Tabela 14. Efeito de β -amirina no modelo de dor pela imersão da cauda, em camundongos: participação de receptores opióides.	103
Tabela 15. Efeito da dose-resposta de morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos.	Apêndice
Tabela 16. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: Análise de efeito cumulativo da associação de β -amirina e morfina e participação dos receptores opióides.	106
Tabela 17. Efeito do triterpeno β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos.	Apêndice
Tabela 18. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: análise de efeito cumulativo da associação de β -amirina + morfina e participação dos receptores opióides.	Apêndice
Tabela 19. Efeito de β -Amirina no trânsito intestinal, com carvão ativado, em camundongos: participação de receptores opióides.	111
Tabela 20. Efeito de β -Amirina na dor visceral induzida por ácido acético.	Apêndice
Tabela 21. Efeito de β -Amirina no modelo de dor da Placa Quente: Participação dos receptores opióides.	118

LISTA DE SIGLAS

α - alfa

β - beta

° C – graus Celcius

μ g – micrograma

μ L- microlitro

AINEs – antiinflamatório não esteroideal

ATP – adenosina trifosfato

COX-2 – cicloxigenase 2

DE50 – dose eficaz de 50%

E.P.M. – erro padrão da média

g – grama

h – hora

HIV – vírus da imunodeficiência adquirida

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

i.p. – via intraperitoneal

IV – infra vermelho

Kg – kilograma

LC – limite de confiança

mg – miligrama

mg/kg – miligrama por kilo

min – minutos

mL – mililitro

NMDA - n-metil- D- apartato

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PGE₂ – prostaglandina E₂

PKC – proteína C quinase

s – segundos

s.c. – via subcutânea

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervo Periférico

TRP – receptores de canais de potencial transitório

TRPV1 – receptor de potencial de canal transitório 1

v.o. – via oral

Vs. – vesus

% - percentual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Página 20
1.1. Dor	21
1.1.1. Transmissão da dor	23
1.1.2. Sistemas modulatórios da dor	24
1.2. Dor nociceptiva	26
1.3. Dor neuropática	27
1.4. Dor orofacial	28
1.5. Drogas opióides	31
1.5.1. Tolerância, Dependência e Efeitos adversos	32
1.6. Receptores TRPV	34
1.6.1. Capsaicina e nocicepção	34
1.7. Diabetes e dor	36
1.8. Termometria	37
1.9. Produtos Naturais	38
1.9.1. Produtos Naturais e analgesia	41
1.9.2. Resinas Naturais	42
1.9.3. Terpenos	43
1.9.3.1.1. Triterpenos	44
1.9.3.2. <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March.	46
1.9.3.3. α e β -Amirina	49
2. OBJETIVOS	53
2.1. Geral	54
2.2. Específicos	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3. Material	57
3.1. Material botânico.	57
3.2. Animais de experimentação.	57
3.3. Drogas e reagentes.	58
3.4. Equipamentos	58
4. MÉTODOS	59
4.1. Obtenção da mistura do triterpeno β -amirina (extração e fracionamento).	59
4.2. Atividade antinoceptiva.	61
4.2.1. Nocicepção orofacial induzida por capsaicina.	62
4.2.1.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1 e do sistema opióide.	63
4.2.2. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica no teste de dor orofacial induzida por capsaicina.	63
4.2.3. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica retal no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina.	65

4.2.4. Nocicepção ocular induzida por capsaicina: “Eye wiping test”.	66
4.2.4.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1 e do sistema opióide.	66
4.2.5. Estudo da atividade antinociceptiva de β -Amirina em animais diabéticos.	66
4.2.5.1. Indução de hiperglicemia por aloxano em camundongos.	67
4.2.5.2. Avaliação do efeito da β -Amirina em animais diabéticos no teste da dor orofacial induzida por capsaicina.	67
4.2.5.2.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1, opióide e de Óxido Nítrico.	67
4.2.5.3. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos.	68
4.2.6. Nocicepção orofacial induzida por formalina.	68
4.2.6.1. Estudo do efeito da associação de β -amirina e Morfina na dor orofacial induzida por formalina.	69
4.2.6.2. Estudo do envolvimento do sistema opióide.	69
4.2.7. Efeito da β -amirina sobre a resposta alimentar em animais submetidos ao teste de nocicepção induzida por formalina.	69
4.2.8. Efeito de β -amirina na atividade antinociceptiva visceral: Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	70
4.2.8.1. Estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides.	70
4.2.9. Teste da Placa Quente.	71
4.2.10. Avaliação do efeito da β -Amirina no Teste da Imersão de Cauda em camundongos.	71
4.2.10.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide.	72
4.3. Efeito de β -Amirina no Trânsito intestinal de camundongos.	72
4.4. Análise estatística.	73
5. RESULTADOS	74
5.1. Nocicepção orofacial induzida por capsaicina	75
5.2. Estudo do mecanismo termorregulador local da β -Amirina após injeção orofacial de capsaicina em camundongos	80
5.3. Nocicepção ocular induzida por capsaicina: “Eye wiping test”	88
5.4. Estudo da nocicepção orofacial induzida por capsaicina em animais diabéticos	92
5.4.2. Efeito da β -Amirina sobre a resposta térmica no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos	95
5.4.3. Avaliação do efeito da β -Amirina no Teste da Imersão de Cauda em animais diabéticos	100
5.5. Avaliação do efeito da β -Amirina no Teste da Imersão de Cauda, em camundongos normais	102
5.6. Nocicepção orofacial induzida por formalina	104
5.6.1. Avaliação de dose-resposta de Morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina	104
5.6.2. Avaliação do efeito de β -Amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina	108
5.7. Efeito da β -Amirina sobre a resposta alimentar em animais submetidos ao teste de nocicepção induzida por formalina	109

5.8. Avaliação do efeito da β -Amirina no modelo de Trânsito intestinal	111
5.9. Efeito de β -Amirina na atividade antinoceptiva visceral: Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	113
5.10. Avaliação do efeito da β -Amirina no Teste da Placa Quente	117
6. DISCUSSÃO	120
7. CONCLUSÕES	134
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
APÊNDICES	153

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

Um dos principais, senão o principal, motivo de busca por assistência médica em todo o mundo é a manifestação de dor, em diversos níveis e origens. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), ela é definida como uma subjetiva e desagradável experiência sensorial e emocional, que está normalmente associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termo de tal dano (PETERSON *et al.*, 1993; MILLAN, 1999; PORRECA *et al.*, 2002).

A dor está presente como sintoma em muitas desordens clínicas, afetando uma grande parcela da população e sendo prejudicial à boa qualidade de vida. Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), 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. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado nos últimos anos, constituindo a causa principal de sofrimento, limitação ou incapacitação para as atividades normais de trabalhadores, estudantes, e pessoas das mais variadas classes sociais e ocasionando graves consequências psicossociais e econômicas. Em muitas situações, a dor funciona como um sistema de advertência que pode tornar-se crônico (COLOMBINI, 1991; COWAN *et al.*, 2001; PORRECA *et al.*, 2002; SBED, 2009).

Porém, nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores deflagra necessariamente uma experiência de dor. A relação entre a percepção da dor e a ativação dos nociceptores envolve uma cascata de eventos através de vias sensoriais. A natureza altamente subjetiva da dor é um dos fatores que dificulta a sua compreensão e tratamento clínico (BASBAUM *et al.*, 2000). Uma distinção entre dor e nocicepção se faz necessária, pois o termo nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores

sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999). Por outro lado, a dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional normalmente associado aos quadros dolorosos (COUTAUX *et al.*, 2005).

Dentre as diversas formas de classificação, podemos falar quanto à sua origem fisiopatológica, que a dor pode ser nociceptiva, neurogênica, neuropática, inflamatória e psicogênica. A dor nociceptiva ocorre quando existe um traumatismo nos receptores nociceptivos, devido a alterações na sua estrutura anátomo-funcional com liberação de substâncias algogênicas nos tecidos. A dor neurogênica é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações. A dor neuropática é resultante do processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central, como, por exemplo, a dor do membro fantasma. A dor inflamatória caracteriza-se pela sensibilização dos neurônios produzida pela ativação da cascata de citocinas e a dor psicogênica é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequência de problemas psicológicos (MENEZES, 1999; RANG *et al.*, 2007).

1.1.1. Transmissão da dor

A transmissão da dor envolve uma complexa interação de estruturas periféricas e centrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral. O sinal nociceptivo está sujeito a uma variedade de modulações facilitadoras e inibitórias a partir do nociceptor até as estruturas cerebrais envolvidas na percepção e cognição da dor (BROMM; LORENZ, 1998; FÜRST, 1999). As terminações nervosas livres são receptores sensoriais especializados chamados de nociceptores (ativados por estímulos nocivos). Esses receptores possuem alto limiar de ativação, sendo então ativados por estímulos intensos que são danosos ou potencialmente danosos aos tecidos, e, portanto, não são recrutados em estímulos inócuos (CAILLIET, 1993; DJOUHRI; LAWSON, 2004).

A percepção da dor é complexa, envolvendo não apenas a transdução de um estímulo nociceptivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso

cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). Por envolver fatores fisiológicos e psicológicos, em animais, a dor é avaliada de forma indireta. Assim, o componente fisiológico da dor é chamado de nocicepção, e os modelos experimentais animais de dor são modelos de nocicepção (TJØLSEN *et al.*, 1992).

A dor nociceptiva inicia-se quando as terminações nervosas livres, das fibras do sistema nervoso periférico (SNP) – fibras mielínicas finas A δ e amielínicas C -, de qualquer parte do corpo, são ativadas por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos. Após a sensibilização ocorre a despolarização da membrana neuronal e os estímulos acessam o corno posterior da medula espinhal, ascendendo para as estruturas da região do tronco cerebral (sistema reticular), o tálamo (núcleos talâmicos sensitivos), as estruturas do sistema límbico (amígdala, hipotálamo, hipocampo, giro cíngulo) e as áreas corticais (PIMENTA, 2006).

Ao sistema reticular do tronco cerebral são atribuídas as respostas de luta ou fuga (respostas neurovegetativas) que estão presentes nos quadros dolorosos; no tálamo, a informação dolorosa é discriminada, localizada espacialmente e projetada em estruturas do sistema límbico e cortical. Em estruturas do sistema límbico (sistema das emoções), é atribuído à dor o caráter de emoção desagradável e de sofrimento. Em seguida, a dor é projetada em diversas estruturas corticais (córtex sensitivo, motor, frontal) (PIMENTA, 2006).

A estimulação dos nociceptores periféricos causa o envio da informação nociceptiva ao sistema nervoso central (SNC) através das fibras aferentes. Os longos axônios das fibras nociceptivas que se localizam em nervos periféricos estendem-se de seus corpos celulares contidos no gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e para inervar os tecidos corporais (MILLAN, 1999).

A transmissão sináptica entre neurônios aferentes primários e neurônios do corno dorsal da medula espinhal é mediada, principalmente, por glutamato atuando em receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazoil ácido propiônico). Além disso, outras substâncias podem modular a

transmissão na medula (ATP, prostaglandinas, substância P) (DOUBELL *et al.*, 1999). Na medula, a transmissão dos sinais dolorosos após a liberação dos neurotransmissores envolve a participação de canais iônicos. Os principais canais envolvidos nesses efeitos são os canais de sódio, os canais de cálcio operados por voltagem e os canais de potássio (LEE *et al.*, 2005).

1.1.2. Sistemas modulatórios da dor

A dor pode ser controlada por mecanismos centrais, uma vez que o sistema nervoso possui circuitos modulatórios que modificam a percepção da dor. O local principal desta modulação é a medula espinhal, onde a interconexão entre vias nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supra-espinhais, porém estruturas encefálicas também participam da analgesia (BASBAUM; JESSELL, 2003).

O corno dorsal da medula espinhal é o local onde neurônios eferentes serotoninérgicos e/ou noradrenérgicos fazem sinapses com os neurônios de projeção e interneurônios inibitórios encefalinérgicos. Ainda nesta região, a ativação de interneurônios inibitórios gabaérgicos inibe a liberação de neurotransmissores nociceptivos excitatórios (glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) por neurônios de projeção (MALCANGIO; BOWERY, 1996).

Além disso, a lesão tecidual ou nervosa acarreta a ativação de fibras aferentes primárias que aumentam a sensibilidade dos neurônios espinhais, desenvolvendo um fenômeno chamado de sensibilização central. Esta sensibilização resulta a ativação de vias intracelulares neuronais mediadas por proteína quinase C (PKC) e/ou tirosinas quinases, que atuam fosforilando e aumentando a atividade dos receptores NMDA, assim facilitando a transmissão sináptica (DOUBELL *et al.*, 1999).

Geralmente, a sensibilização central persiste até o término do estímulo nociceptivo periférico, mas há casos em que esse processo pode se prolongar, mesmo após o desaparecimento do estímulo (DWORKIN *et al.*, 2003). O fenômeno de sensibilização central juntamente com o de sensibilização periférica medeia os

processos de hiperalgesia e alodínia (TREEDE *et al.*, 1992). A hiperalgesia é a resposta excessiva a estímulos nocivos, enquanto que a alodínia é a resposta nociceptiva a estímulos normalmente não nocivos (KIDD; URBAN, 2001).

1.2. Dor nociceptiva

A palavra nocicepção deriva do latim (nocere: nocivo; capêre: captar, receber), significando literalmente a captação do nocivo. Refere-se à recepção de sinais pelo SNC, onde ocorre a ativação de receptores sensoriais especializados que transmitem informações (a transformação dos estímulos ambientais em potenciais de ação) que são transferidas para o sistema nervoso central por vias nervosas íntegras. Esses receptores são chamados de nociceptores e são representados por terminações nervosas livres presentes em fibras aferentes sensitivas, principalmente as fibras C e A-delta. As fibras aferentes primárias cutâneas sensitivas podem ser classificadas essencialmente em cinco tipos com base no diâmetro, estrutura e velocidade de condução. As fibras C são finas, amielínicas e de condução lenta; as fibras A-delta são médias, pouco mielinizadas e de condução intermediária; e as fibras A-beta são calibrosas, mielinizadas e de condução rápida. Há ainda as fibras A alfa e as fibras A gama que são de grosso calibre e estão associadas a propagação de estímulos táteis. Cada classe de fibras aferentes codifica informações sensoriais, mas diferem na sensibilidade à estímulos nocivos ou não nocivos. Em condições normais apenas as fibras A delta e C são capazes de transmitir informação nociceptiva (MILLAN, 1999).

De forma geral, durante a exposição a um estímulo nocivo as fibras mielinizadas A delta iniciam uma fase rápida, que é primária da dor, aguda por natureza, enquanto que, as fibras C invocam a segunda fase que é a de dor latejante e lenta. Os receptores de alto limiar localizados geralmente nas fibras C codificam informações pertencentes a estímulos nocivos mecânicos, químicos ou térmicos. É abundante o tipo de nociceptores que respondem a estímulos nocivos térmicos e mecânicos e o termo polimodal reserva-se à população de nociceptores que responde também a estímulos químicos irritantes além dos térmicos e mecânicos (MILLAN, 1999).

A atividade dos receptores nociceptivos é modulada pela ação de substâncias químicas denominadas de algio gênicas, que estão presentes no ambiente tecidual e são liberadas localmente, quando frente a algum estímulo. Essas substâncias algio gênicas são liberadas por diversas fontes, como mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, células traumatizadas e são responsáveis pela hiperalgesia observada em lesões traumáticas, inflamatórias e isquêmicas. Então além de estimular diretamente os nociceptores essas substâncias também podem torná-los sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos de baixa intensidade (VALE, 2003; MILLAN, 1999).

Dentre as principais substâncias algio gênicas encontramos: acetilcolina, prostaglandinas, bradicinina, histamina, citocinas, serotonina, substância P, neurotrofinas, radicais ácidos, íons potássio dentre outras. O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P podem ser liberadas retrogradamente pelas terminações nervosas nociceptivas e podem, indiretamente, participar da liberação de vários mediadores químicos por células, na chamada inflamação neurogênica (MILLAN, 1999).

Outra classe de nociceptor que recentemente vem atraindo interesse no contexto da dor prolongada: os chamados “silenciosos” ou “nociceptores dormentes”. Entretanto nenhuma classe de nociceptores apresenta atividade espontânea, o termo “silencioso” refere-se a uma porção (talvez 10-20%) de fibras C amielínicas na pele, articulações e vísceras que normalmente não são responsivas a estímulos nocivos agudos. Nas condições de inflamação e injúria tecidual, esse nociceptores silenciosos são sensibilizados e ativados por uma variedade de mediadores químicos. O recrutamento desses nociceptores durante os estados patológicos deve contribuir para a somação temporal e espacial aumentando o envio de informação das fibras C para o corno dorsal da medula espinhal. Por exemplo, fibras aferentes primárias em articulações artríticas desenvolvem tanto atividade espontânea como emitem sinais em resposta a movimentos articulares antes inofensivos, e a inflamação de vísceras pode aumentar enormemente sua sensibilidade para estímulos mecânicos inócuos (MILLAN, 1999; CERVERO *et al.*, 1994).

A ativação de nociceptores silenciosos pode explicar a natureza distinta dos estados inflamatórios dolorosos prolongados quando comparado à exposição aguda a estímulos nocivos passageiros. De fato, o recrutamento de nociceptores silenciosos promove uma importante contribuição para a sensibilização e as mudanças de adaptação central que suportam a hiperalgesia primária causada por inflamação tecidual (MILLAN, 1999).

O caminho entre a exposição inicial ao estímulo nocivo e a apreciação consciente da dor é uma extraordinária complexa e interativa série de mecanismos pelo qual o estímulo nocivo é codificado como mensagem nociceptiva e é progressivamente transmitida aos e processada nas estruturas cerebrais superiores. Tal evento modulatório ocorre na periferia, no corno dorsal da medula espinhal (processamento primário), sítios supra espinhais como o tálamo (processamento secundário), assim como nas estruturas corticolímbicas (VALE, 2003; MILLAN, 1999).

1.3. Dor neuropática

A dor neuropática é uma das principais condições dolorosas crônicas, onde geralmente não há nenhum dano tecidual. Neste caso, ocorre uma disfunção das vias que transmitem dor, levando a uma transmissão crônica dos sinais dolorosos. As lesões nos nervos sensoriais periféricos são provavelmente a causa mais comum. Quando os pacientes necessitam de tratamento medicamentoso por tempo prolongado após traumatismos, o diagnóstico de dor neuropática deve ser considerado. Diabetes e HIV são uma das principais causas deste tipo de neuropatia (COSTIGAN *et al*, 2009).

A dor neuropática central tem sido descrita em várias lesões do sistema nervoso central, incluindo lesões vasculares, traumáticas, desmielinizantes, degenerativas, infecciosas e neoplásicas. A esclerose múltipla pode produzir neuralgia trigeminal se houver desmielinização do gânglio de Gasser. Os opióides têm sido apontados como efetivos em dor neuropática. Embora tradicionalmente

considerados como ineficazes em alguns pacientes, isso não se aplica para a maioria dos indivíduos. Os opióides estão ganhando popularidade no tratamento da dor crônica não neoplásica. O maior avanço tem sido o desenvolvimento de opióides de ação lenta que permitem níveis plasmáticos estáveis por períodos prolongados. (COSTIGAN *et al*, 2009; MALAIRAJAN *et al*, 2006; DECOSTERD *et al*, 2004; GILL e OAKLANDER, 2001).

Costigan (2009) esclarece que a dor e queda da função estão intimamente associadas com a reação do sistema nervoso para o dano neural, e ambos são importantes para o diagnóstico. A dor neuropática periférica resulta de lesões do SNP, que podem ser causadas por traumas mecânicos, distúrbios metabólicos, neurotóxicos químicos, infecções ou tumores invasivos e envolve uma variedade de patofisiologias múltiplas no SNP e no SNC.

1.4. Dor orofacial

A dor orofacial é um problema comum a todas as áreas da odontologia, pois pode ser causada por cárie, algumas afecções periodontais, aparelhos ortodônticos, próteses mal adaptadas ou outras doenças das estruturas bucais. Adicionalmente, o próprio tratamento odontológico, em geral, determina algum grau de desconforto ou dor (WANNMACHER; FERREIRA, 1999). Verifica-se, também, dor orofacial com frequência em associação à mucosite e neurotoxicidade associada à cirurgia e quimio-radioterapia (BENOLIEL *et al*, 2007; EPSTEIN *et al*, 2007).

Atualmente a dor orofacial apresenta alta prevalência na população (LeRESCHÉ, 2001; FEINMANN e NEWTON-JOHN, 2004), com significativo interesse no paciente por conta dos aspectos emocional e psicológicos a ela relatados (TENENBAUM *et al.*, 2001; SESSLE, 2005).

Observa-se uma maior incidência durante a segunda metade da vida de um indivíduo e, em três quartos dos casos, a dor é percebida pela primeira vez após a idade de 50 anos. O início tardio, após 65 ou 70 anos de idade, é relativamente freqüente, sendo seu início vislumbrado excepcionalmente antes dos 20 anos. A mulher é acometida mais que o homem, com uma razão de 3:2. A neuralgia que apresenta um caráter familiar é difícil de ocorrer, porém quando acontece tende a se iniciar mais precocemente e a se tornar bilateral mais freqüentemente que nas formas comuns (LAMA e MELO, 2003).

Andrade (2001) relata que a manifestação da sensação assemelha-se a sucessivas pontadas, queimação, choques elétricos, contato com ferro quente ou até mesmo, milhares de agulhas penetrando a face. A dor é paroxística, de caráter fulgurante e de curta duração, podendo aparecer e desaparecer subitamente e reaparecer em intervalos variados. Cada surto pode ter a duração de dias, semanas ou meses. A intensidade dos fenômenos dolorosos, sempre difícil de apreciar, parece habitualmente grande. Durante um acesso, o doente interrompe toda sua atividade, para falar e sua expressão facial traduz um sofrimento extremo (LAMA e MELO, 2003).

Segundo Pelissier (2002), a região orofacial é um ponto de freqüente dor aguda e crônica. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse tipo de dor são pobremente estudados. Esta é em parte, o motivo da escassez de investigações direcionadas para a área orofacial. São poucos os modelos com animais de laboratório dedicados ao estudo da nocicepção na região trigeminal, com exceção para os modelos de dor neuropática trigeminal (VOS *et al*, 1994) e o teste de formalina orofacial (CLAVELOU *et al*, 1989, 1995).

O modelo de dor orofacial descrito por Pellisier, Pajot e Dallei (2002) induz a dor por ação de um agente álgico (capsaicina ou formalina) através da administração do mesmo na vibrissa do animal e permite o estudo da dor trigeminal ou nociceptiva (**Figura 1**).

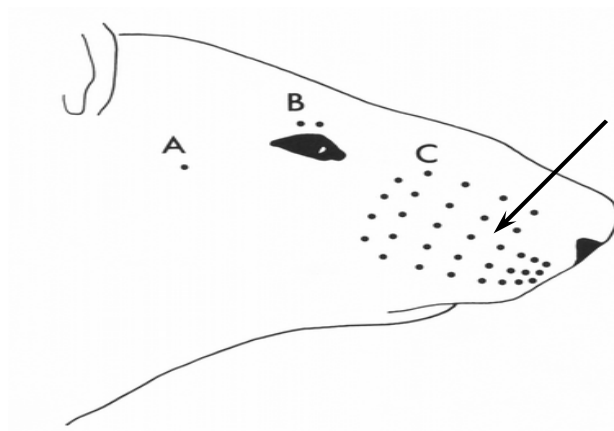


Figura 1. Vibrissa de camundongo: seta indica o local de aplicação de agente lesivo.

(Fonte: psycnet.apa.org/index.cfm?)

1.5. Drogas opióides

Os analgésicos opióides compreendem um grupo de fármacos naturais e sintéticos com estrutura química e efeitos semelhantes aos dos alcalóides do ópio, cuja ação analgésica, euforiante e ansiolítica é conhecida há séculos. São efetivos no controle da dor visceral e somática e, parcialmente, efetivos no controle da dor neuropática (PIMENTA, 2006).

A morfina foi descoberta em 1805, pelo assistente de farmácia Freidrich Sertuner, ao isolar este alcalóide a partir da resina da papoula (*Papaver somniferum*). Em alusão à sonolência que este causava, Sertuner denominou este opiáceo em homenagem ao deus dos sonhos: Morfeu. Atuando em receptores específicos no sistema nervoso, a morfina é utilizada como analgésico para o tratamento de dores crônicas, principalmente de pacientes terminais. Amplamente

popularizada, desde a década de 50 até hoje é requisitada nestes casos supracitados.

Opiáceos, como a morfina, representam atualmente a melhor opção para controle de dor moderada à grave em traumas induzidos, pós-operatório e na dor oncológica. Os compostos opiáceos estão cada vez mais sendo usados para tratamento de doenças crônicas não relacionadas à dor crônica do câncer patológico. No entanto, a administração prolongada de opióides é associada com problemas significativos, incluindo o desenvolvimento de tolerância antinociceptiva, onde altas doses da droga são necessárias ao longo do tempo para obter a mesma resposta analgésica. E estas doses mais elevadas são também relacionadas ao aumento da sensibilidade à dor, um conceito conhecido como hipernocicepção tátil induzida por opióides (WHITE e WILSON, 2010).

1.5.1. Tolerância, Dependência e Efeitos adversos

O uso repetido e prolongado de opióides reduz gradualmente a eficácia analgésica, ou seja, induz tolerância, que pode ocorrer após algumas semanas de uso. Porém, o aumento da dose necessária para alívio da dor pode ser causada pela progressão da doença e aumento do estímulo doloroso. Vários mecanismos são propostos para o desenvolvimento de tolerância relacionada ao uso de opióides: aumento do metabolismo, alteração da densidade dos receptores, atividade de receptores NMDA e aumento de colecistocinina. Também é sugerido que essa tolerância poderia ser decorrente da redução do número de receptores ou pela diminuição da sensibilidade de receptores (apesar de não se observar redução importante no número destes após exposição aos opióides) (SAKATA e ISSY, 2008). A tolerância é um fator limitante do uso dos opióides.

A exposição crônica aos opióides pode provocar dependência física. A dependência física é um fenômeno associado ao uso prolongado, que pode acontecer após 3 semanas de tratamento, associada ao surgimento de sintomas de abstinência com suspensão abrupta da droga ou após administração de um antagonista opióide, manifestando-se mais rapidamente que a tolerância. Ocorre

com a inibição de adenilciclase seguida de retorno gradual da atividade normal (SAKATA e ISSY, 2008).

Outro fator importante no cuidado com o uso de drogas opióides é o surgimento de efeitos colaterais, que são o principal motivo de queixas dos pacientes, em especial aqueles de uso crônico: sedação, euforia, disforia, agitação, alucinação, hiperalgesia, convulsão, diminuição da frequência respiratória, redução da resistência vascular sistêmica, diminuição da pressão arterial e bradicardia, constipação, náusea, vômito, retenção urinária, disfunção sexual, miose, rigidez muscular e mioclonia, imunossupressão, diminuição de cortisol, hormônio luteinizante e foliculo-estimulante, testosterona e estrógeno, aumento da prolactina (SAKATA e ISSY, 2008).

O uso concomitante de opióides com outros grupos de drogas analgésicas mais fracas contribuem para o controle da dor e atenuam o desenvolvimento de tolerância (NAVEBI *et al*, 2009).

1.6. Receptores TRPV

Uma das estratégias para gerar novos analgésicos consiste no estudo das bases moleculares que estão envolvidas na detecção dos estímulos dolorosos, no caso, os receptores. Um receptor de grande importância para a fisiologia sensorial e da dor é o TRPV1, pertencente à família de receptores de canais de potencial transitório termossensíveis. Referidos pelo “termo TRP” (Cortright e Szallasi, 2009), detectam estímulos mecânicos, químicos e térmicos (Bevan e Anderson, 2009) e são expressos em tecidos sensoriais, como nociceptores e pele. Ao contrário do uso tradicional de drogas analgésicas que suprimem a inflamação (por exemplo, AINEs e inibidores de COX-2) ou bloqueiam a transmissão da dor (por exemplo, opiáceos), os inibidores de canais TRP objetivam evitar a dor, bloqueando o receptor onde esta é gerada (Cortright e Szallasi, 2009).

A recente clonagem e caracterização dos receptores TRPV1 a partir dos tecidos animais (CATERINA et al., 1997) e humanos (HAYES et al., 2000), foi decisivo na identificação do alvo molecular dos ligantes para esta classe de receptores de membrana. Estes ligantes podem ser distribuídos em vários grupos, como os capsaicinóides (capsaicina, resiniferatoxina, piperina, eugenol, capsazepina e vermelho de rutênio), os gingeróis, os terpenos dialdeídos insaturados, os triprenilfenóis e os ingenosídeos (CALIXTO et al., 2005).

Um importante papel tem sido atribuído aos receptores TRPV1 na pesquisa da dor. Evidências sugerem que a regulação e ativação destes receptores são determinadas por diversos mecanismos, tendo em vista que o canal iônico é regulado por mediadores lipídicos, pH ácido (prótons), temperatura (acima de cerca de 42°C), fosfolipídeos e fosforilação, além de produtos de natureza química ou sintética (CATERINA & JULIUS, 2001; CALIXTO et al., 2005). Assim, estes receptores representam um alvo promissor para novos compostos analgésicos.

1.6.1. Capsaicina e nocicepção

Diversos modelos animais são empregados no estudo de novas drogas analgésicas derivadas de produtos naturais. Nestes modelos experimentais a nocicepção pode ser induzida por agentes químicos, mecânicos, térmicos e inflamatórios.

A capsaicina é um composto extensamente utilizado em animais e humanos no estudo dos mecanismos envolvidos na dor para avaliação da eficácia de várias drogas analgésicas. A ativação dos nociceptores pela capsaicina promove a liberação de glutamato e peptídeos neuromodulatórios a partir dos seus neurônios sensitivos aferentes, bem como peptídeos pró-inflamatórios, tais como substância P e CGRP de seus terminais periféricos. Estes eventos neuroquímicos são responsáveis pela hiperalgesia e inflamação, comumente observadas após

administração de capsaicina em humanos e animais de laboratórios (BARRET et al., 2003).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é principal ingrediente da pimenta vermelha, planta do gênero *Capsicum*. Capsaicina é estimulante seletivo dos neurônios aferentes sensoriais da raiz do gânglio dorsal nos mamíferos, formados por fibras não mielinizadas C e mielinizadas A δ , as quais respondem a estimulação nociva (térmica, mecânica e química) (CATERINA & JULIUS, 2001).

Os receptores para capsaicina e os neurônios sensíveis à capsaicina modulam funções fisiológicas tais como manutenção da integridade tecidual. Dessa forma, a inibição dos receptores TRPV1 ou a dessensibilização das fibras sensíveis à capsaicina, tanto podem ser benéficas como podem produzir perda de algumas funções fisiológicas (NAGY et al., 2004).

Durante as décadas passadas, pesquisadores têm direcionado seus estudos sobre o papel da capsaicina na dor e inflamação. Um considerável número de estudos já foi realizado sobre os efeitos sensoriais da capsaicina quando aplicada sobre a pele ou na pleura, ou quando injetada intradermicamente em humanos ou em animais experimentais (SAADÉ et al., 2002).

A injeção intraplantar de capsaicina em um roedor produz padrão de comportamento de dor característico, tais como lambar e morder a pata afetada (NAH et al., 2000), produzindo alterações significativas nos limiares de nocicepção térmica e mecânica. Uma vez ativado pela capsaicina, os neurônios aferentes secretam neuropeptídeos (substância P e CGRP) induzindo a inflamação neurogênica. Cada um desses peptídeos é conhecido por interferir em um ou mais mecanismos envolvidos na reação inflamatória. Por exemplo, a substância P, pode contribuir para vasodilatação, liberação de histamina de mastócitos e modular as funções das células do sistema imune, que expressam receptores para substância P em sua membrana citoplasmática. CGRP é conhecido por sua vasoativa e por seus efeitos sobre as células imunológicas (SAADÉ et al., 2002).

1.7. Diabetes e dor

Diabetes mellitus tem se manifestado como uma epidemia já há muitas décadas e vem crescendo na medida em que aumenta a população mundial e, está também relacionada com o aumento da prevalência de obesidade e a redução da atividade física pela população economicamente ativa. O Centro de Prevenção e Controle de Doenças estima que 20,8 milhões de crianças e adultos (7,0% da população dos EUA) tinham diabetes no ano de 2005. Deste total, 1,5 milhões foram de novos casos diagnosticados e em torno de 30% (6,2 milhões) não foram diagnosticados. Estima-se que 54 milhões de pessoas sejam pré-diabéticas (ZHANG, 2009).

Segundo Lerco (2003), diabetes mellitus é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam mais de 150 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Organização Mundial de Saúde para 2025 sugerem que esse número possa chegar a 300 milhões. Em 2000, os seis países com o maior número de pacientes diabéticos eram: Índia (32,7 milhões), China (22,6 milhões), Estados Unidos (15,3 milhões), Brasil (12 milhões), Paquistão (8,8 milhões) e Japão (7,1 milhões) (OMS 2001). De acordo com Franco e col., (1998), no Brasil, aproximadamente 50% das pessoas com diabetes desconhecem sua condição mórbida sendo que 10% delas são portadoras de diabetes do tipo I. Em alguns países esse percentual sobe para 80% (OMS 2001).

Embora se reconheçam os avanços conseguidos, lamentavelmente o diabetes ainda é, hoje, uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador 25 vezes mais propenso à cegueira, 17 vezes mais susceptível à nefropatia, com chances cinco vezes maiores de uma amputação de membros e o dobro de risco de uma doença cardiovascular (LERCO, 2003; KRÓLEWSKI e col., 1987; La PORTE, 1985).

O diabetes mellitus tipo 1 desenvolve-se quando mais de 90% das células β pancreáticas são destruídas, como resultado de uma agressão química, viral ou auto-imune. A variabilidade na extensão da morte das células produtoras de insulina não é somente determinada pela severidade da condição citotóxica, mas também pela

intensidade de mecanismos de defesa celular, que podem ser induzidos ou ativados nestas células pancreáticas. Os mecanismos deste efeito protetor ainda não estão completamente elucidados, mas podem envolver a geração de substâncias intracelulares que são depletadas durante o processo de injúria celular (PIPELEERS & VAN DE WINKEL, 1986).

A neuropatia diabética periférica é uma complicação crônica comum do diabetes mellitus. Os sintomas desta condição debilitante incluem a perda progressiva da sensação térmica e dor tátil. Entretanto muitos indivíduos com diabetes neuropática experimentam uma redução na percepção, uma fração de aproximadamente 10% experimentam sintomas dolorosos (VINIK *et al*, 2000; SUGIMOTO *et al*, 2000; ANAND *et al*, 1996).

Pesquisas do grupo de Controle de Diabetes e suas Complicações (1993) demonstrou que um intensivo controle da glicemia por 5 anos reduz a incidência de neuropatia em até 60% em indivíduos com diabetes tipo 1, sugerindo que a desregulação do metabolismo da glicose contribui para a neuropatia. Entretanto, o fato de que a regulação estrita da glicose não previne completamente a neuropatia diabética, sugerindo que mecanismos adicionais da patologia devam existir. A neuropatia sensorial pode ser detectada em alguns indivíduos quando tem destruído a tolerância a glicose, porém, não pode ser usado como um critério de diagnóstico para o diabetes (GABRA *et al*, 2006; SMITH *et al*, 2001).

A ocorrência de hiperalgesia devido a hiperglicemia em alguns modelos da doença em ratos pode sugerir que os aspectos da percepção sensorial alterado pode ser independente do metabolismo da glicose. Estudos adicionais sugerem que a deficiência de insulina ou a insensibilidade à ela pode contribuir para o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica. A sinalização direta de insulina reverteu a neuropatia em animais diabéticos induzidos por estreptozocina, foi obtida pela administração intratecal de insulina (SIMA, 2004; BRUSSE, 2004; PIERSON *et al*, 2003).

No estudo de Pabbidi *et al* (2008), com animais diabéticos induzidos por estreptozocina para o estudo do envolvimento de receptores TRPV1 na neuropatia

diabética periférica, observaram que neste modelo, os animais com a neuropatia manifestaram uma fase inicial de hiperalgesia térmica e uma fase tardia de hipolgesia. Esses fenótipos são acompanhados por altas e baixas regulações de TRPV1, respectivamente.

A indução do diabetes mellitus experimental em modelos animais permite a identificação de agentes terapêuticos e preventivos. O aloxano induz diabetes Mellitus tipo 1, destruindo as células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e amilina que reduzem a taxa de açúcar no sangue. O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais comumente utilizado, agindo na destruição específica de células de β das Ilhotas de Langerhans, quando em doses adequadas (LERCO, 2003; ZANOELLO et al, 2002).

Segundo estudo de Malaise et al (1982), essa citotoxicidade seletiva do aloxano é condicionada pela grande capacidade da célula β em acumular a droga, aliada ao fato desta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos. Sugere-se que a toxicidade do aloxano seja resultado de sua habilidade em gerar radicais de oxigênio altamente reativos que afetam o metabolismo oxidativo da célula, com subsequente morte celular. Apesar desta proposta de mecanismo, o modo de ação do aloxano é suficientemente geral para que outras substâncias, de ocorrência natural, sejam diabetogênicas por mecanismos similares (LERCO, 2003; ZANOELLO et al, 2002; ABEL-RAHMAN et al, 1992; HEIKKILA et al, 1976).

1.8. Termometria / Termografia

A temperatura é um dos mais importantes sinais vitais usados na medicina clínica. Hipócrates foi o primeiro a mensurar a temperatura do corpo em seus escritos. O método da termometria foi reproduzido e revalidado como a mensuração de distribuição de temperatura pelo corpo (Termografia). Portanto, a história da termografia é mais longa que a própria medicina clínica (OTSUKA *et al*, 2002).

Fibras motoras simpáticas controlam a microcirculação cutânea por meio de vasoconstricção ou vasodilatação, causando menor ou maior irrigação na pele. Este fenômeno de controle de transferência de calor através da pele é definido como termorregulação e é dependente do controle do sistema nervoso autônomo. Os tecidos isquêmicos costumam apresentar diminuição da temperatura e palpando-se com o dorso da mão é possível sentir um esfriamento quando comparado com o lado contralateral. Porém, a capacidade humana de discriminar diferenças de temperatura é pouco sensível, em média valores maiores que 2°C (BURIHAN, 2001, ABERNATHY *et al*, 1984).

De acordo com Brioschi *et al* (2003), a termometria cutânea é definida como um método diagnóstico que avalia a microcirculação da pele e que, indiretamente, também avalia o sistema nervoso autônomo simpático estreitamente relacionado com a pele.

O procedimento de medição utiliza um sistema mecânico que posiciona um sensor próximo ao paciente e computadores que fornecem a representação gráfica qualitativa, de alta resolução e quantitativa, de alta sensibilidade, dos padrões térmicos presentes na pele humana (BRIOSCHI *et al*, 2003; BRIOSCHI *et al*, 2000).

As imagens térmicas geradas em alta resolução detectam doenças, alterações fisiológicas e podem ser usadas no monitoramento de tratamentos médicos. Tem sido aplicado nas áreas de oncologia, quiropraxia, ortopedia, odontologia, neurologia, medicina ocupacional, medicina vascular / cardiológica, medicina veterinária

1. 9. Produtos Naturais

O uso de espécies vegetais, com fins de tratamento e cura, observa-se desde o início da civilização humana envolvendo o manuseio, a adaptação e a modificação do uso dos recursos naturais para seu próprio benefício (STASI, 2002).

Consideram-se produtos naturais todos aqueles derivados naturalmente de plantas, animais, microorganismos, minerais e organismos marinhos. Foram, e continuam sendo, a mais bem sucedida fonte de drogas destinadas aos mais variados usos, em especial, o medicinal. Historicamente, a mais importante fonte natural tem sido as plantas. A pesquisa utilizando plantas medicinais tem avançado em duas linhas principais: a etnofarmacologia e a toxicologia, cujas estratégias têm levado à descoberta de diversas substâncias com potencial terapêutico (CALIXTO, 2005; SCHMIDT et al., 2008; TULP & BOHLIN, 2004).

Um grande número de produtos naturais de origem vegetal, descobertos antes da década de 1940, ainda tem grande utilização nos dias de hoje, como a quinina (*Cinchona*), morfina e codeína (Opium), digoxina (*Digitalis*), atropina e hioscina (*Solanaceae*). Da mesma forma, durante a segunda guerra, alguns antibióticos, desenvolvidos de isolados dos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*, também continuam em uso. No período pós-guerra, houve um declínio no número de descobertas de novas drogas a partir de plantas superiores: como o tranquilizante reserpina (*Rauwolfia*) e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), droga efetiva no tratamento do câncer, com venda global da ordem de 100 milhões de dólares ao ano (KONG et al., 2003).

A partir dos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, foi possível compreender os diversos fenômenos relacionados à biologia celular e molecular e à eletrofisiologia, permitindo que estruturas biológicas fossem identificadas, isoladas e clonadas. O que tornou possível à indústria farmacêutica modelar drogas providas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade (CALIXTO, 2003).

As plantas medicinais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos, servindo como base para o desenvolvimento de medicamentos pela indústria farmacêutica (SCHENKEL et al., 2001). São uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos. O número de espécies vegetais superiores (angiospermas e gimnospermas) no planeta é estimado em 250.000, podendo variar entre 215.000 a 500.000. Destas, apenas 6% têm sido estudadas sobre atividade

biológica e aproximadamente 15% avaliadas fitoquimicamente (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

Atualmente, menos de 1% de todas as plantas encontradas nas florestas tropicais tiveram suas propriedades farmacológicas estudadas. Pelo menos 25% de todas as drogas atuais são oriundas ou derivadas de moléculas encontradas nestas regiões (KONG et al, 2003).

No Brasil, a indústria de medicamentos concentra significativa parcela de recursos na produção de Fitoterápicos. Os problemas mais frequentemente encontrados nestes produtos são: identificação botânica equivocada, composição química sem uniformidade, presença de contaminantes, bula irregular, prazo de validade determinado empiricamente. Todas estas questões demonstram a deficiência e precariedade, desde a matéria prima até o produto acabado. A nova legislação submete a indústria ao desenvolvimento de tecnologias que assegurem e confirmem a eficiência formulação. É neste contexto, que as monografias oficiais tornam-se um instrumento que permite atender as necessidades da indústria de fitoterápicos, fornecendo dados importantes na produção dos mesmos (MIGUEL & MIGUEL, 2000).

Em se tratando do consumo de plantas medicinais da flora nativa, este é feito de forma empírica principalmente pelas comunidades de média e baixa renda, e cuja utilização é propagada por usuários e comerciantes, em especial nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. A Organização Mundial de Saúde estima que entre 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento, dependem primariamente das plantas medicinais na atenção primária à saúde. Dessa forma, as plantas medicinais por constituírem matéria prima de fácil acesso, de baixo custo e de fácil manipulação, têm contribuído de sobremaneira para a saúde da população. São bilhões de pessoas utilizando essa alternativa, porém somente uma pequena percentagem sob indicação médica (OLIVEIRA, 2005).

Muitos são os fatores, sobretudo econômicos e sociais, que colaboram para o uso de plantas medicinais. Sendo assim, o trabalho de pesquisa com plantas medicinais tende a produzir medicamentos com custo inferior e mais acessível à

população, a qual muitas vezes não consegue arcar com os custos elevados da aquisição de medicamentos em atendimento às necessidades básicas de saúde. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, dessa forma, o controle e comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, também é bastante precária.

De acordo com Vieira Junior (2005), estudos multidisciplinares envolvendo etnobotânicos, químicos, farmacólogos e agrônomos são necessários para que sejam ampliados os conhecimentos acerca das plantas medicinais, sob aspectos de suas ações, efeitos tóxicos relacionados, interações com medicamentos alopáticos e estratégias mais adequadas para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos.

1.9.1. Produtos naturais e analgesia

Há tempos, as substâncias derivadas de produtos naturais têm sido utilizadas com vários propósitos incluindo o tratamento da dor. O ópio, por exemplo, é conhecido e utilizado a cerca de 7000 anos. No início do século 19, alguns componentes individuais de diferentes produtos naturais foram identificados e purificados. Atualmente, a descoberta de novas drogas tem limitado o uso de produtos naturais como exclusiva fonte de terapêutica. Entretanto, os produtos de origem natural vêm dominando a indústria farmacêutica, já por vários anos, e muitas drogas comercializadas são baseados em isolados destes produtos. O recente ressurgimento do estudo de produtos naturais, especialmente para a indústria de suplementação alimentar é sinal deste interesse comercial. A indústria farmacêutica vem oferecendo investimento na revitalização de programas de “screening” de produtos naturais. Pesquisas acadêmicas continuam a ser uma grande fonte de informação no campo de produtos naturais, especialmente em respeito à descoberta de novas entidades químicas. As pesquisas na área de dor e adicção de drogas eram originalmente focadas nos produtos naturais, exclusivamente. Porém, os análogos de substâncias naturais e compostos sintéticos baseados nestes produtos têm sido incorporados à pesquisa. O uso racional de drogas exige novas

substâncias sintéticas, e os produtos naturais são investigados no foco de novas estruturas químicas que possam interagir com os analgésicos já conhecidos e utilizados. A farmacologia da dor é um complexo campo de pesquisa e mais sistemas envolvidos são explorados à medida que as pesquisas avançam, porém, é a partir de suas pesquisas que novas drogas são identificadas (McCURDY e SCULLY, 2005).

1.9.2. Resinas Naturais

Diversas famílias botânicas (Pinaceae, Hamamelidaceae, Leguminosae, Zigofilaceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Umbeliferae, etc.) são produtoras de resinas que em geral encontram-se dissolvidas em óleos essenciais líquidos e voláteis. Esse líquido obtido por incisão no próprio vegetal, não tem composição simples (COSTA, 1994). Os óleos-resina quando expostos ao ar e à luz endurecem por evaporação e oxidação das essências, resultando em substância de natureza consistente com características próprias. As resinas são produtos amorfos de natureza química complexa. Fisicamente são duras, transparentes ou translúcidas, insolúveis em água, mas podem ser dissolvidas em álcool ou em outros solventes orgânicos. As resinas queimam com uma chama fumarenta característica e são provavelmente produtos da oxidação de terpenos (ROBBERS et al., 1997).

Muitas propriedades são atribuídas às resinas, dentre estas podemos destacar: atividade antiinflamatória e antitumoral da resina do gênero *Boswellia* (BÜCHELE et al., 2003). *Pistacia lentiscus* var. Chia produz uma resina com atividade antioxidante *in vitro* (ANDRIKOPOULOS et al, 2003). A resina extraída das espécies *Commiphora* (*C. kua* e *C. confusa*) (Burseraceae) é usada popularmente no tratamento de picada de cobra, gonorréia, desordens estomacais e nas infecções microbianas (MANGURO et al., 2003a, MANGURO et al., 2003b). Das partes aéreas de *Baccharis grisebachii* (Asteraceae), exsuda uma resina, a qual é usada no tratamento de úlceras, queimaduras e inflamação da pele (FERESIN et al., 2003). Outras atividades conferidas às resinas incluem: anti-séptica, expectorante, carminativa, antiespasmódica, emanagoga e anti-helmíntica. Externamente, os óleos-resina são utilizados devido as sua propriedade desinfetante, cicatrizante,

rubefaciente, vesicante e como parasiticida no tratamento da sarna (COSTA, 1994). O óleo-resina de *Commiphora molmol* (Burseraceae), conhecida como “mirra”, é utilizado na medicina árabe no tratamento de algumas condições inflamatórias, como antipirética, anti-séptica, estimulante e na cicatrização de diferentes problemas estomacais, incluindo câncer. A análise química detectou a presença de óleos voláteis, goma e resina, a qual é formada por esteróides e triterpenos, como por exemplo, 3-epi- α - amirina (AL-HARBI et al., 1997).

A atividade antioxidante também é observada nas resinas naturais. Mais recentemente, Assimopoulou et al. (2004) demonstraram que a resina de *Pistacia lentiscus* var. Chia, e o óleo essencial obtido de *Commiphora myrrh* e *Boswellia serrata*, apresentam significativa atividade. Os principais componentes das resinas são álcoois e ácidos tetracíclicos e pentacíclicos, sendo este último o grupo mais importante, incluindo várias substâncias resinosas (COSTA, 1994).

Muitas espécies de *Protium* exsudam uma resina aromática empregada na preparação de incensos utilizados em rituais religiosos, e na medicina tradicional por suas propriedades biológicas (DEHARO et al., 2001). A partir de incisões obtém-se um exsudato resinoso utilizado na medicina popular com antiinflamatório, analgésico e na cicatrização de feridas (CORRÊA, 1984; PERNET, 1972; SIANI et al., 1999).

1.9.3. Terpenos

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores. Representam a segunda maior classe de metabólitos secundários com maior número de constituintes ativos (STASI, 2002). Encontram-se subdivididos em classes e são caracterizados por composição denominada unidade de isopreno, por isso, esses compostos também são chamados de isoprenóides.

1.9.3.1. Triterpenos

Os triterpenos pertencem à classe dos terpenos e são formados por seis unidades de isopreno. Apresentam estrutura do tipo C₃₀, policíclica, normalmente tetra ou pentacíclica, quase sempre hidroxilados na posição C-3. Já foram isolados mais de quatro mil triterpenóides naturais e identificados mais de quarenta tipos de esqueletos (ROBBERS et al., 1997). Os triterpenóides podem ser dividido em três grupos principais: β -amirina (oleanano), α -amirina (ursano) e lupeol. As agliconas do tipo β -amirina possuem duas metilas em C-20. Aquelas do tipo α -amirina apresentam uma metila no C-20 e outra em C-19 com a estereoquímica entre os anéis D/E na forma *cis*. Já os triterpenos do tipo lupeol difere na estereoquímica entre os anéis D/E, que é *trans* e no número de carbonos do quinto anel (E), o qual é formando por cinco átomos de carbono (SHENKEL et al., 1999).

Entre as drogas vegetais conhecidas, ricas em triterpenos pentacíclicos, podemos destacar, o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) (BALTINA, 2003), quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) (BOYAKA et al., 2001), castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) (LEACH, 2004), *Centella asiatica* L. (GNANAPRAGASAM et al., 2004) e *Polygala senega* L. (ESTRADA et al., 2000).

Há um crescente interesse nos triterpenóides devido ao seu variado espectro de atividades farmacológicas (PATOCKA, 2003). Existem muitos trabalhos sobre as ações biológicas dos triterpenos, os quais podem ser relevantes pelos seus efeitos farmacológicos, incluindo suas propriedades antiinflamatórias (SAFAYHI & SAILER, 1997). A propriedade antiinflamatória é comum aos compostos desta classe, principalmente aqueles triterpenos pertencentes às classes oleanano, ursano ou lupano (MÁÑEZ et al., 1997). Estudos mostraram triterpenos, na forma de aglicona ou heterosídeo, inibindo a enzima COX-2 (ciclooxygenase) e a produção de NO (óxido nítrico) (SHIN ET al., 2005); modulando a expressão de moléculas de adesão, via inibição de NF-kappaB (ZHANG et al., 2003), ou ainda inibindo a isoenzima fosfodiesteradse (PDE4), um novo alvo intracelular para novas drogas antiinflamatórias (WENIGER et al., 2005).

As raízes de *Rosa rugosa* (Rosaceae) são tradicionalmente utilizadas na Coréia no tratamento da diabetes mellitus e da inflamação crônica. Jung et al. (2005) demonstraram que quatro triterpenos do tipo 19 α -hidroxiursano, isolados a partir do

fracionamento do extrato metanólico desta espécie, podem ser os responsáveis pelas atividades antiinflamatórias e antinociceptiva em modelos clássicos de dor e nocicepção observados em camundongos e ratos. *Carmona retusa* é utilizada nas Filipinas na forma de chá preparado a partir das folhas secas e disponível em tabletes de 250 mg, sendo indicada no alívio dos sintomas da diarreia. Villasenõr et al. (2004), demonstraram que o principal constituinte desta planta é formado por uma mistura de triterpenos, composta de α -amirina, β -amirina e baurenol, a qual exibiu um potente efeito analgésico e antidiarréico. Preparações feitas a partir da goma-resina de *Boswellia serrata* são utilizadas tradicionalmente na Índia para o tratamento de doenças antiinflamatórias. A goma é rica em triterpenos pentacíclicos, sendo o ácido boswellico o principal constituinte. Experimentos realizados com este triterpeno demonstra que este inibe a biosíntese de leucotrienos nos granulócitos neutrófilos através de uma inibição não-competitiva da enzima 5-lipoxigenase (AMMON et al., 2002). Experimentos clínicos mostraram resultados promissores em pacientes com artrite reumatóide, colite crônica e ulcerativa na doença de Crohn's e dentre outras patologias (KIELA et al., 2004). Além desses efeitos, estudos mostram que o ácido boswellico possui atividade anticancerígena, antitumoral, e anti-hiperlipidêmica (HUANG et al., 2000).

Os analgésicos atuais, tais como opióides e as drogas antiinflamatórias não esteroidais, não são adequados a todos pacientes. Particularmente é na dor crônica, onde se observa suas limitações, como por exemplo, nos numerosos efeitos colaterais, incluindo propensão à tolerância. Dessa forma, a pesquisa visando a descoberta de outras terapias alternativas é necessária. E as plantas medicinais, conhecidas por serem importante fonte de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos, são fundamentais para este fim. Portanto, a pesquisa com plantas utilizadas tradicionalmente pela população no alívio de dores desempenha papel estratégico na busca de novas drogas analgésicas (VONGTAU et al., 2004).

1.9.3.2. *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 que é popularmente conhecido como almecegueira, breu-branco verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro bravo (CORRÊA, 1984).

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March é uma árvore de grande porte, com altura que varia de 10 a 20 metros (**Figura 2**), com ocorrência em todo o Brasil, vegetando em terrenos arenosos, tanto úmidos quanto secos (CORRÊA, 1984). Esta espécie fornece madeira moderadamente pesada (densidade 0,77 g/cm³), 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 3**); 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).

Do tronco da espécie *Protium heptaphyllum* March, quando lesionado, exsuda uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas, cujas aplicações gerais são: fabricações de vernizes e tintas, na calafetagem de embarcações, em rituais religiosos, em cosméticos, repelente de insetos e aromatizante de ambientes (**Figura 4**). Em sua forma natural a resina é utilizada na medicina popular como antiinflamatório, gastroprotetora, analgésica, expectorante e cicatrizante de feridas (SIANI et al., 1999). Utilizações essas, que vem se confirmando a partir de pesquisas experimentais (OLIVEIRA et. al. 2004b).

A partir de estudos químicos do óleo-resina proveniente de *P. heptaphyllum* foram caracterizados e isolados muitos constituintes. 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.

Dentre as plantas do gênero *Protium*, algumas vêm sendo estudadas e têm demonstrado propriedades farmacológicas variadas. Estudo realizado por Otuki et al. (2001) demonstra que a atividade antinociceptiva de uma fração etérea obtida de *P. kleinii*, está relacionada, em parte, com a presença de triterpenos no extrato desta planta.

Siani et al. (1999), avaliaram a atividade antiinflamatória *in vivo* e *in vitro* de óleos essenciais obtidos da resina e folhas de várias espécies do gênero *Protium*. Neste trabalho, os óleos essenciais obtidos da resina *P. heptaphyllum* (PHP) e das folhas de *P. strumosum* (PS), *P. grandifolium* (PG), *P. lewellyni* (PL) e *P. hebetatum* (PHT) foram avaliados em modelos de inflamação e nocicepção em camundongos.

Os óleos de PHP, PS e PL inibiram significativamente o extravasamento de proteínas no modelo de pleurisia induzida por zymosan. Já os óleos de PG, PL e PHT inibiram o acúmulo de neutrófilos, enquanto os óleos de PHP e PL inibiram o acúmulo de eosinófilo na cavidade pleural induzido por LPS. Já *in vitro* os óleos de PHP e PS inibiram a produção de óxido nítrico induzido por LPS. O efeito antinociceptivo não foi observado com nenhum dos óleos quando os mesmos foram administrados por via oral. Na busca de novas drogas com potencial atividade contra a malária, a resina *Protium glabrescens*, tradicionalmente utilizada devido as suas propriedades antiinflamatória e analgésica, mostrou significativa atividade antimalárica *in vivo* contra o parasita *Plasmodium falciparum* (DEHARO et al., 2001).



Figura 2. Espécie adulta de *Protium heptaphyllum* March. (LORENZI, 1992).



Figura 3. Galho com folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* March. (LORENZI, 1992).



Figura 4. Queima do exsudato óleo-resinoso de *Protium heptaphyllum* March. (LORENZI, 1992).

1.9.3.3. α e β -Amirina

A mistura de triterpenos pentacíclicos α e β -Amirina (**Figura 5**) é o constituinte majoritário da resina do *P. hepthaphyllum* (VIEIRA-JÚNIOR, et al 2005). Essa mistura de triterpenos pode ser encontrada em outras espécies vegetais como *Moldenhawera nutans* (VALE et al, 2005), *Achillea alexandri-regis* (KUNDAKOVIC et al, 2004), *Sideritis candicans* Ait (HERNANDEZ-PEREZ et al, 2004) e *Carmona retusa* (VILLASENOR et al, 2004).

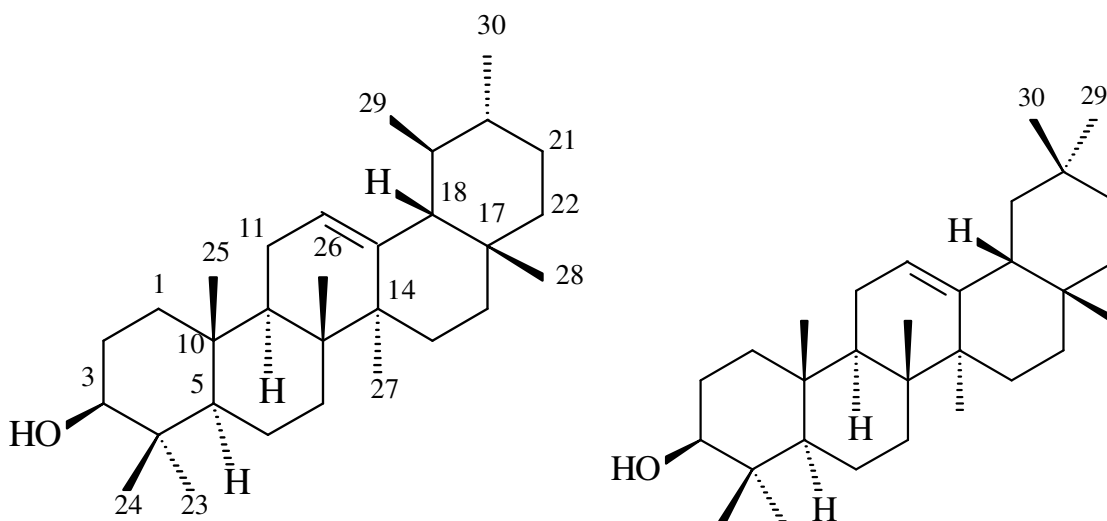


Figura 5. Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos α -Amirina (à esquerda) e β - amirina (à direita).

Otuki et al. (2005a) demonstraram a atividade antinociceptiva da mistura de α e β -amirina, isolada do *Protium kleinii*, envolvendo a participação da proteína quinase C e proteína quinase A, e a atividade antiinflamatória tópica da α -amirina (OTUKI et al., 2005b). Medeiros et al. (2007) demonstraram o mecanismo da atividade antiinflamatória tópica de α -amirina, que envolve a supressão de PGE_2 por

mecanismos envolvendo a supressão da expressão de COX-2 e bloqueio da ativação de NF κ B. Observou-se também uma atividade ansiolítica, antidepressiva e atividade antiagregante plaquetária da mistura de α e β -amirina (Aragão et al., 2006; Aragão et al., 2004), bem como uma ação antilipoxigenase (Kweifio-Okai et al., 1992).

Otuki et al. (2005b) evidenciaram que o extrato etéreo ou seu principal constituinte ativo, um triterpeno pentacíclico denominado α -amirina isolado do mesmo vegetal, apresentaram pronunciado efeito antiinflamatório em modelo de inflamação tópica. Dando continuidade ao estudo com *P. kleinii*, Otuki et al. (2005a) mostraram ainda que a mistura de dois triterpenos pentacíclicos, α -amirina e β -amirina, isolados da resina desta planta produziu, de forma dose dependente, expressiva antinocicepção em modelos de nocicepção inflamatória induzidos por ácido acético, formalina e capsaicina em camundongos.

A atividade antinociceptiva também foi observada por Aragão (2004). Neste estudo, a mistura de triterpenos α -amirina e β -amirina, isolada de *P. heptaphyllum* mostrou efeito antinociceptivo em modelos agudos de nocicepção induzidos por ácido acético, formalina e placa quente, além das atividades antiinflamatórias (antiedematogênica), ansiolítica e antiagregante plaquetária.

Nosso laboratório mostrou que a mistura de α e β -amirina possui propriedade gastroprotetora (Oliveira et al., 2004a), antipruriginosa (Oliveira et al., 2004b), antinociceptiva visceral (Lima-Júnior, 2006), hepatoprotetora (Oliveira et al., 2005) e inibidora da expressão de receptor NK-1 em modelo de cistite hemorrágica (Lima-Júnior et al., 2007). Em 2008, Holanda Pinto, avaliou o efeito antiinflamatório e antinociceptivo da mistura de α -amirina e β -amirina em modelo de dor periodontal e na nocicepção orofacial em ratos. Na doença periodontal, a mistura de triterpenos modulou o processo inflamatório na fase aguda com atividade antiinflamatória nas fases aguda e crônica da periodontite. Na nocicepção orofacial induzida por capsaicina e por formalina, a mistura de α -amirina e β -amirina, exerceu atividade antinociceptiva.

Yunes *et al* (2001) comenta que a fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. Dentro desta perspectiva, esperava-se que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Além disso, existe no país um grande número de grupos de pesquisa que tem contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas.

No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. O mercado mundial de fitoterápicos (compreendido como extratos vegetais, ou seja, de uma mistura de vários compostos, química e farmacologicamente quantificados) cresce gradativamente, e mais notável e lamentável ainda é que cresce muito mais nos países desenvolvidos que naqueles que não o são. A primeira observação considerada com respeito ao aprimoramento da tecnologia farmacêutica na área de fitoterápicos, que permitiu um melhor controle de qualidade de fármacos baseado na moderna tecnologia de identificação, determinação e quantificação de compostos químicos, tornando possível a fabricação de fitofármacos seguros, eficazes e de efeito totalmente reprodutível. Por outro lado, os avanços na pesquisa de fitoterápicos a nível farmacológico, toxicológico e molecular permitiram constatar que estes apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido, com avaliação toxicológica segura, e estudos de farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica realizados segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros (YUNES *et al*, 2001).

Atualmente parece haver um maior interesse da indústria no desenvolvimento de fitoterápicos ou fitofármacos, talvez estimulada pela nova lei de regulamentação de medicamentos ou pela nova lei de patentes no Brasil.

Com base nestas informações e com o crescente interesse na elucidação das atividades biológicas dos triterpenóides e os estudos, já relatados na literatura,

envolvendo alguns destes compostos, como o ácido ursólico, ácido oleanólico, lupeol, a mistura de α - e β -amirina, e com o isolamento dos constituintes desta mistura, α -amirina e β -amirina, e a escassez de trabalhos sobre as atividades farmacológicas de cada uma, decidimos investigar os seus efeitos farmacológicos, em especial na sua atividade antinoceptiva.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Com base nos dados apresentados até o momento, decidimos investigar os efeitos farmacológicos do triterpeno isolado β -amirina de *P. heptaphyllum* March, com os seguintes objetivos:

2.1. Geral

✓ Na busca de encontrar uma alternativa eficaz de analgésicos opióides com baixos efeitos colaterais, este estudo tem como principal objetivo analisar o potencial do triterpenóide pentacíclico β -Amirina, em vários modelos de nocicepção aguda.

2.2. Específicos

✓ Avaliar um possível efeito modulador da β -amirina no modelo de Dor Orofacial induzida por capsaicina, em camundongos normais e diabéticos;

✓ Estudar a possibilidade do envolvimento de receptores opióides e TRPV1 na produção da antinocicepção pela β -amirina no modelo de Dor Orofacial induzida por capsaicina, em camundongos normais e diabéticos;

✓ Estudar a possível relação entre a Variação Térmica Periférica local e a resposta à dor orofacial no modelo de nocicepção por capsaicina, em camundongos normais e diabéticos, bem como avaliar a participação dos receptores opióides e TRPV1 neste processo;

- ✓ Avaliar o efeito modulador da β -amirina no modelo de Dor Orofacial induzida por formalina, em camundongos e analisar a participação dos receptores opióides e TRPV1 neste efeito;
- ✓ Averiguar o efeito de β -Amirina no consumo de dieta líquida rica em proteína em camundongos submetidos à Dor Orofacial induzida por formalina;
- ✓ Avaliar o efeito da associação de β -Amirina e Morfina, em diferentes proporções de DE50 e sua eficácia na antinocicepção, utilizando o modelo de dor orofacial induzida por formalina.
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva de β -Amirina visceral no modelo de Contorções Abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos;
- ✓ Avaliar a atividade nociceptiva de β -Amirina nos modelos de Imersão de Cauda e Placa Quente, em camundongos;
- ✓ Estudar o efeito de β -Amirina no Trânsito Intestinal de camundongos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS

3. 1. Material botânico

O material de estudo, o triterpeno β -amirina, foi obtido a partir da resina bruta de almécega (*Protium heptaphyllum* March), proveniente do município de Timom / MA, pela Prof^a. Dr^a. Mariana Helena Chaves. A espécie foi coletada nesse local e identificada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, pela botânica Dra. Roseli Farias de Melo Barros, e registrada a exsicata com o número 18.247.

3. 2. Animais de experimentação

Camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss Webster, adultos, machos, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno, a temperatura média de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”.

Os protocolos utilizados neste trabalho possuem aprovação do Comitê 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.	Quimex, Brasil
Ácido fosfórico	Vetec, Brasil
Capsaicina	Sigma, USA
Capsazepina	Sigma, USA
Carvão Ativado	Reagen, Brasil
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Etanol absoluto	Sigma, USA
Formaldeído P. A.	Sigma, USA
Leite condensado (Vale Dourado®)	Vale Dourado®, Brasil
Morfina (Sulfato de Morfina – Dimorf®)	Cristália, Brasil
Naloxona (Cloridrato de Naloxona - Narcan®)	Cristália, Brasil
N-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME)	Sigma, USA
Tween 80	Riedel, Alemanha
Vermelho de Rutênio	Aldrich, USA

3. 4. Equipamentos.

Equipamento	Origem
Balança para animais (modelo MF-6)	Filizola®, Brasil
Balança analítica (modelo AX-200)	Shimadzu®, Japão
Banho - Maria (modelo Q249)	Quimis®, Brasil
Câmera de infravermelho (modelo T360)	Flir Systems, Brasil
Homogeneizador (modelo MA 102)	Marconi®, Brasil
Material Cirúrgico	ABC Instrumentos Cirúrgicos Ltda, Brasil
Placa Quente (modelo DS37)	Ugo Basile®, Itália
Pipetas automáticas	Jencons Scientific Inc. ®, USA
Seringas Plásticas	B-D- Plastic
Termômetro Digital	TermoMed, Brasil

4. MÉTODOS

4. 1. Obtenção da mistura do triterpeno β -amirina (extração e fracionamento)

A extração e separação de α e β -amirina da resina bruta foram realizadas conforme descrito em Vieira-Junior et al (2005). A mistura de α e β -amirina (6,68 g) foi purificada através de uma coluna RP-18 usando MeOH/CH₂Cl₂ (9:1) (modo reciclante) com rendimento de 58,0,05 % (4,0 g) para α -amirina e 34,9% (2,4 g) para β -amirina. Os compostos foram identificados por comparação de seus dados espectroscópicos com o valor da literatura (MAHATO e KUNDU, 1994).

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram registrados em um espectrômetro Varian Inova 500 em 500 e 125 MHz, respectivamente, usando TMS como padrão interno. HPLC foi realizada usando uma coluna Shimadzu ®, Shimpack - LC RP-18, 250 x 50 mm, 12 μ m, detecção: UV (215 nm), vazão de 20 mL/min.

A metodologia de extração, fracionamento e caracterização dos componentes da fração M-19 foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Mariana Helena Chaves, do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí e apresenta-se, esquematicamente na **Figura 6**.

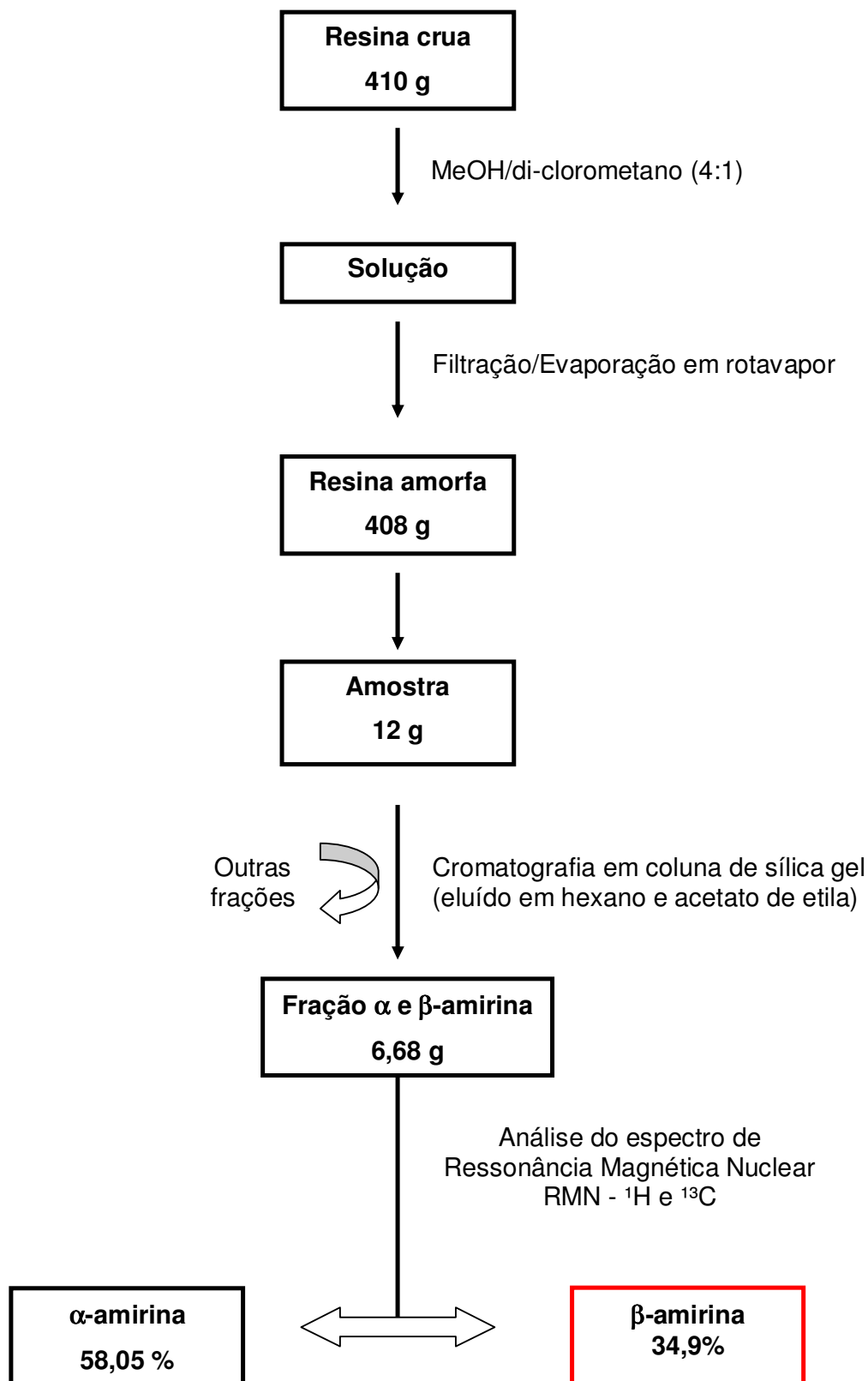


Figura 6: Fluxograma de isolamento do triterpeno β -amirina da resina de *Protium heptaphyllum* March.

4.2. Atividade antinoceptiva.

Para analisar o possível efeito antinoceptivo oral das amirinas, optou-se pelos modelos de dor orofacial induzidos tanto por capsaicina (que analisa a resposta à dor neurogênica) quanto por formalina (que indica duas fases e sensibilidade dolorosa: a primeira fase – 0 a 5 minutos após a administração de formalina - revela a dor neurogênica e a segunda fase – 20 a 30 minutos após – a resposta tônica a dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos) (Hunskar e Hole, 1987; Murray *et al*, 1988; Lapa, 2002).

A pesquisa da ação analgésica com ação antiinflamatória foi realizada com a introdução do modelo experimental de contorção abdominal por ácido acético e complementado com testes mais seletivos para ação analgésica exercida por mecanismos centrais, utilizando a placa quente e a imersão de cauda. Esses modelos de reação ao calor medem a latência da resposta de fuga ou de autoproteção contra o estímulo doloroso (LAPA, 2002).

Como a dor orofacial, especialmente aquela causada por compressão do nervo trigêmeo, é um dos motivos da incapacidade da atividade de alimentação normal, realizamos um teste de avaliação da ingestão alimentar, oferecendo bebida protéica à animais submetidos à dor orofacial induzida por formalina.

Analizamos também o efeito da amirina no trânsito intestinal de camundongos, pois a velocidade deste trânsito é um dos fatores que determina a intensidade de absorção e regula a biodisponibilidade de fármacos administrados via oral. Algumas drogas utilizadas no tratamento da dor, como a morfina (um potente analgésico opióide), alteram esse trânsito, causando constipação severa, um dos efeitos colaterais mais frequentes e indesejáveis em pacientes em tratamento da dor crônica (LAPA, 2002).

Um novo parâmetro de avaliação do efeito da amirina na nocicepção em comparação ao modelo da dor orofacial foi utilizado: a determinação da temperatura local por equipamento de captação via infravermelho, sendo um modelo não invasivo com alta sensibilidade à variações mínimas da temperatura periférica.

A pesquisa deste trabalho também incluiu testes de nocicepção em animais diabéticos, pois a dor neuropática diabética é uma importante complicação do diabetes mellitus sendo um dos difíceis tipos de dor para tratamento, neste grupo de pacientes (KUHAD, SHARMA and CHOPRA, 2008)

Em todos os modelos descritos a seguir, utilizou-se camundongos Swiss (25-30g), machos, divididos em grupos de, geralmente, 8 animais cada, postos para ambientação no local do teste, uma hora antes dos testes.

4.2.1. Nocicepção orofacial induzida por capsaicina (PELLISIER, PAJOT, DALLEI, 2002).

Neste modelo, os animais foram tratados com controle (água destilada + 0,05% Tween; 10 mL/kg; v.o.) e as drogas testes. Após 1 hora dos tratamentos administrados por via oral e 30 minutos por via subcutânea ou intraperitoneal, a nocicepção química foi induzida com a administração de 20 µL de solução de capsaicina (20 µL, 1,5 µg, 80% PBS + 10% Tween 80 + 10% Etanol absoluto), na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e quantificado o tempo gasto, em segundos, pelo animal lambendo ou coçando o focinho, durante 10 minutos após a administração da capsaicina.

Determinamos a DE50 de morfina, para avaliar qual concentração seria mais adequada para o uso neste modelo. As concentrações utilizadas foram 0,75; 1,5; 3,0; 5,0 e 7,0 mg/kg.

Inicialmente, testou-se as amirinas, α -amirina e β -amirina, nas concentrações de 10, 30 100 mg/kg; v.o., a fim de determinar o efeito na nocicepção no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina. Utilizou-se morfina (5 mg/kg, s.c.) como droga controle positivo para este teste.

Com a resposta antinoceptiva de β -amirina neste modelo, determinamos seu LC50 (Limite de Confiança de 50%), utilizando-se morfina (5 mg/kg, s.c.) como droga controle positivo para este teste.

4.2.1.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1 e do sistema opióide.

O estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizado com antagonista competitivo dos receptores TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e, antagonista opióide, naloxona (1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e morfina (5 mg/kg).

4.2.2. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica no teste de dor orofacial induzida por capsaicina.

A administração de capsaicina, por via subcutânea, em animais de experimentação em doses de 1-10 mg/kg, induz de forma dose dependente, queda da temperatura corporal, que persiste por um período de 2 a 5 horas (Sziskay et al, 1982). Quando baixas doses de capsaicina são administradas na vibrissa, no teste de nocicepção, a temperatura local aumenta nos primeiros minutos e retorna gradativamente até os valores iniciais.

A termografia é uma técnica não invasiva, sem contato, que detecta a área de superfície aquecida com radiação IV (TURNER, 1991). A pele apresenta características físicas de um corpo negro, ou seja, absorve toda radiação que nele incide, portanto a temperatura cutânea, resultado da emissão de infravermelho, calor radiante, origina-se de fonte interna de calor. Devido ao estado do metabolismo basal e a circulação sanguínea, um padrão termal anormal pode significar a área de inflamação superficial. Porém, este método, isoladamente, não é suficiente para distinguir entre uma injúria induzida na resposta inflamatória e um procedimento

mecânico, porém pode ser importante quando associado à outros métodos (Hoogmoed & Snyder, 2002).

A fim de avaliar a variação da temperatura, durante o teste de nocicepção orofacial induzida por capsaicina, os animais de cada grupo, foram escaneados com câmera de infravermelho T360 (“Flir Systems”: com detector de microbalômetro com matriz de plano focal (“focal plane array”), portátil, com resposta espectral de 7-13 microns, resolução 320 x 240 pixels, sensibilidade térmica de 0,06°C em temperatura ambiente de 22°C, mantida a 50 cm da vibrissa do animal, área de operação de temperatura de 0 a 120°C). **(Figura 7)**

A termografia foi captada antes do início dos tratamentos, logo após a administração de capsaicina e 10 minutos após esta administração. As imagens captadas e armazenadas em mídia digital foram analisadas por “software” específico (FLIR Quick Report – Versão 1.2 – SP1 – 1.0.1.204 – de domínio público, disponível via internet no endereço <http://www.flir.com/thermography/americas/us/content/?id=18272>) com mensuração da temperatura em diferentes regiões na imagem.

Os grupos estudados foram separados em: controle (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.) e morfina (5 mg/kg; s.c.). Após 1 hora dos tratamentos administrados por via oral e 30 minutos por via subcutânea, a nocicepção química foi induzida com a administração de 20 μ L de solução de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g, 80% PBS + 10% Tween 80 + 10% Etanol absoluto), na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e a face dos animais escaneada como descrito anteriormente nos tempos 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 minutos após a administração da capsaicina.

O estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizado com antagonista competitivo dos receptores TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e, antagonista opióide, naloxona (1 mg/Kg,

i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e morfina (5 mg/kg).



Figura 7. Posição do animal para a captação de imagem com câmera de infravermelho T360 (“Flir Systems”). (Foto: arquivo pessoal da autora)

4.2.3. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica retal no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina.

Os grupos estudados foram separados em: controle (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.) e morfina (5 mg/kg; s.c.). Após 1 hora dos tratamentos administrados por via oral e 30 minutos por via subcutânea, a nocicepção química foi induzida com a administração de 20 μ L de solução de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g, 80% PBS + 10% Tween 80 + 10% Etanol absoluto), na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e a temperatura retal foi avaliada em $^{\circ}$ C, utilizando-se um termômetro digital, nos intervalos de tempo de 2,5 minutos antes; 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 minutos após a administração da capsaicina.

O envolvimento dos receptores TRPV1 no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizado com antagonista competitivo, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg).

4.2.4. Nocicepção ocular induzida por capsaicina: “Eye wiping test” (SZALLASI, 1989)

Utilizou-se camundongos Swiss (25-30g), divididos em grupos de 6 animais cada, ambientados na sala de experimentação uma hora antes do teste. Os animais foram tratados com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (3, 10, e 30 mg/kg; v.o.) e morfina (5mg/kg, s.c.). Após 1 hora do tratamento com β -amirina e veículo e 30 minutos após a morfina, a nocicepção química foi induzida com instilação de 20 μ L de solução de capsaicina no olho direito de cada animal, quantificando o tempo (segundos) em que o animal coça ou limpa o olho tratado, durante 10 minutos da administração da capsaicina.

4.2.4.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1 e do sistema opióide.

O estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizado com antagonista competitivo TRPV1, Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e, antagonista opióide, Naloxona (1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e Morfina (5 mg/kg).

4.2.5. Estudo da atividade antinociceptiva de β -Amirina em animais diabéticos.

A indução experimental do diabetes Mellitus em modelos animais permite a identificação de agentes terapêuticos e preventivos desta patologia, além de proporcionar um estudo detalhado dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético. O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais comumente utilizado, agindo na destruição específica de células de β das Ilhotas de Langerhans, quando em doses adequadas (Zanoello et al, 2002).

4.2.5.1. Indução de hiperglicemia por aloxano em camundongos.

Camundongos Swiss, em jejum de sólidos por 12 horas, receberam, i.p., Aloxano (200 mg/kg), preparado em tampão fosfato, pH 7,4, no momento do uso. Após 72 horas da administração do Aloxano, a glicemia de jejum (6 horas), medida por glicosímetro. Uma vez que os valores normais da glicemia em camundongos e ratos variam entre 47,7 a 107 mg/ dL (ZANOELLO, 2002), os animais com resultado ~240 mg/dL foram selecionados para o teste de dor, em grupos de 5 a 8 animais cada.

4.2.5.2. Avaliação do efeito da β -Amirina em animais diabéticos no teste da dor orofacial induzida por capsaicina.

Camundongos hiperglicêmicos, após quatro semanas da indução por aloxano, foram divididos em grupos de 6 animais cada e ambientados na sala de experimentação na sala de experimentação uma hora antes do teste. Os animais foram tratados com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.). Após 1 hora do tratamento, a nocicepção química foi induzida com a administração, subcutânea, de 20 μ L de solução de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g, 80% PBS + 10% Tween 80 + 10% Etanol absoluto) na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e quantificado o tempo gasto, em segundos, em que o animal lambe ou coça o focinho, durante 10 minutos da administração da capsaicina.

4.2.5.2.1. Estudo do envolvimento de receptores TRPV1, opióide e de Óxido Nítrico.

A pesquisa do envolvimento dos receptores TRPV1, opióides e o Óxido Nítrico no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizada com antagonista competitivo dos receptores TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg), antagonista opióide, Naloxona (1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina

(30 mg/kg) e Morfina (5 mg/kg) e inibidor de NOS, L-NAME (20 mg/kg. i.p.) 15 minutos antes da administração de β -amirina.

4.2.5.3. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos.

Os animais utilizados, camundongos hiperglicêmicos, após quatro semanas da indução por aloxano, foram divididos em grupos de 6 animais cada e ambientados na sala de experimentação na sala de experimentação uma hora antes do teste. Os grupos estudados foram separados em: controle (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.) e morfina (5 mg/kg; s.c.). Após 1 hora dos tratamentos administrados por via oral e 30 minutos por via subcutânea, a nocicepção química foi induzida com a administração de 20 μ L de solução de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g, 80% PBS + 10% Tween 80 + 10% Etanol absoluto), na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e a face dos animais escaneada nos tempos 0, 5 e 10 minutos após a administração da capsaicina.

O envolvimento dos receptores TRPV1, opióides e o óxido nítrico no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizado com antagonista competitivo dos receptores TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg), antagonista opióide, naloxona (1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e morfina (5 mg/kg) e inibidor de NOS, L-NAME (20 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes da administração de β -amirina.

4.2.6. Nocicepção orofacial induzida por formalina (HUNSKAR & HOLE, 1987, adaptado por LUCCARINI *et al.*, 2006).

Os animais foram tratados com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (3, 10, 30 100 mg/kg; v.o.) e morfina (5mg/kg, s.c.). Após 1 hora do tratamento com β -amirina e veículo e 30 minutos após a morfina, a

nocicepção química foi induzida com uma injeção subcutânea de formalina 0,05 % (20 μ L/animal) na vibrissa direita do animal, com agulha 27, e o tempo gasto, em segundos, pelo animal lambendo ou coçando o focinho, foi registrado durante os períodos de 0-5 minutos (primeira fase) e 20-30 minutos (segunda fase) após administração da formalina.

4.2.6.1. Estudo do efeito da associação de β -amirina e Morfina na dor orofacial induzida por formalina.

Realizou-se este teste para analisar o efeito da associação de β -amirina e de morfina, nas doses de 30:3, 15:1,5 e 7,5:0,75 mg/kg, respectivamente, a fim de avaliar a ação cumulativa destas drogas e sua eficácia na terapêutica da dor. O protocolo seguiu o procedimento descrito anteriormente.

4.2.6.2. Estudo do envolvimento do sistema opióide.

A possibilidade do envolvimento do mecanismo opióide no modelo da dor orofacial por formalina, pela β -amirina e por sua associação com morfina foi observada com o pré-tratamento dos animais com antagonista opióide (naloxona 1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes do tratamento com β -amirina (30 mg/kg), morfina (5 mg/kg) e a associação destas duas.

4.2.7. Efeito da β -amirina sobre a resposta alimentar em animais submetidos ao teste de nocicepção induzida por formalina.

Este modelo foi modificado e adequado no Laboratório de Produtos Naturais, do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia / UFC, com a finalidade de observar a busca alimentar por animais que estejam sob efeito da dor orofacial induzida por formalina, onde a estimulação dolorosa da terminação nervosa do

trigêmeo limita a capacidade de alimentação em portadores de distúrbios neste nervo, mesmo na presença de fome.

Camundongos, pesando entre 25-30 g, foram divididos em grupos de 8 animais cada, em jejum de 4 horas, foram tratados a cada 24 horas, por um período de 7 dias, com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina 30 mg/kg; v.o.), morfina (5mg/kg, s.c.) e um grupo que recebeu a associação de β -amirina + morfina. Após 1 hora do tratamento com β -amirina e veículo e 30 minutos após a morfina, a nocicepção química foi induzida com uma injeção na vibrissa de formalina 0,05 % (20 μ L/animal). A nocicepção foi induzida sempre às 12:00 horas e após esta, cada animal acondicionado em gaiola individual, onde recebeu 200 mL de bebida protéica, em mamadeira própria para animais. Após 60 minutos de exposição à esta bebida, o restante da mamadeira foi quantificado, bem como o resíduo da mesma dentro da gaiola e, por diferença, o volume consumido anotado, diariamente. A bebida protéica (leite condensado – 8,6g + água destilada – 1,6 mL) foi preparada a cada dia do teste. Um grupo controle normal foi introduzido no teste sem receber a indução de dor por formalina.

4.2.8. Efeito de β -amirina na atividade antinoceptiva visceral: Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER *et al*, 1959).

Os animais foram tratados com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (0, 30 e 100 mg/kg; v.o.) 1 hora antes e morfina (5 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes de receberem, i.p., ácido acético 0,6% (10 mL/kg). O número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 minutos começados a contar a partir de 10 minutos da administração do ácido acético.

4.2.8.1. Estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides.

A participação do envolvimento dos receptores TRPV1 e opióides no mecanismo da nocicepção pela β -amirina, foi realizada com antagonista competitivo

dos receptores TRPV1, capsazepina (5 mg/kg, i.p.) pré-tratando os animais 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e, antagonista opióide, naloxona (1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes da administração de β -amirina (30 mg/kg) e morfina (5 mg/kg).

4.2.9. Teste da Placa Quente (método de EDDY e LEIMBACK, 1953).

O teste da placa quente é usado para mensurar a latência de resposta ao estímulo térmico. Este tipo de resposta é operante de integração central.

Os animais, camundongos Swiss (25-30 g), machos, pré-selecionados 24 horas antes do teste, foram colocados, individualmente, numa placa quente de temperatura constante ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$), com tempo de latência ("cut off period") de 20 segundos a fim de evitar lesões nas patas. Os grupos, com 10 animais cada, foram divididos em veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (3, 10, 30 mg/kg; v.o.) e morfina (5 mg/kg; s.c.) e avaliados 30 minutos antes, no momento, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos da administração das drogas.

4.2.10. Avaliação do efeito da β -amirina no Teste da Imersão de Cauda em camundongos (KANNAN *et al*, 1996; RAMABADRAN *et al*, 1989).

Camundongos Swiss, pesando entre 25-30 g, foram divididos em grupos de 6 animais cada, ambientados na sala de experimentação uma hora antes do teste. Os animais foram tratados com veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.), uma hora antes e morfina, 30 minutos antes do teste. Foi imerso 1/3 da cauda do animal de cada grupo em banho de água morna ($52^\circ\text{C} \pm 0,5$) até a manifestação de retirada da cauda ("flicking" resposta) ou apresentação de sinais de luta (tempo de corte: 10 s). O teste foi realizado com cada animal isoladamente e medido no momento da administração das drogas, 30, 60, 90 e 120 minutos após.

4.2.10.1. Estudo do envolvimento do sistema opióide.

A possibilidade do envolvimento do mecanismo opióide no modelo da imersão da cauda pela β -amirina foi observada com o pré-tratamento dos animais com antagonista opióide (naloxona 1 mg/Kg, i.p.), 15 minutos antes do tratamento com β -amirina (30 mg/kg) e morfina (5 mg/kg).

4.3. Efeito de β -Amirina no Trânsito intestinal de camundongos (STICKNY e NORTHUP, 1959).

Foram utilizados camundongos, pesando entre 25-30 g, machos adultos, e divididos em grupo de 8 animais cada, onde receberam veículo (água destilada + 0,05 % Tween; 10 mL/kg; v.o.), β -amirina (30 mg/kg; v.o.) e morfina (5mg/kg, s.c.). Após 1 hora do tratamento com β -amirina e veículo e 30 minutos após a morfina, foi administrado carvão ativado (10%, 0,1 mL/10g), por via oral, a todos os grupos. Transcorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o estômago e intestino delgado removidos, e medido o comprimento total do intestino (da região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo carvão do piloro até a última porção do intestino que continha pelo menos 1 cm contínuo de carvão.

O percentual de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino foi assim determinado:

$$\text{Trânsito Intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

Os resultados expressos em % do percurso do marcador em função do comprimento intestinal total (100%) e as médias $\pm$ erro padrão das médias do trânsito representadas em histogramas. Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância e comparados os grupos controles ($p < 0,05$).

4.4. 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 testes e o grupo controle pelo teste de múltipla comparação de Dunnet e para comparação entre os grupos individuais utilizou-se o teste de Tukey ou Bonferroni, para os dados não paramétricos.

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

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Nocicepção orofacial induzida por capsaicina em camundongos

Na região orofacial (vibrissa), a injeção subcutânea de solução de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g) produziu características comportamentais de resposta nociceptiva consistindo de episódios recorrentes e repetitivos de esfregar a face (“face rubbing”) com maior frequência durante os primeiros 10 minutos. Em camundongos tratados com veículo a capsaicina demonstrou marcadamente aumento da resposta de “face rubbing” ($69,83 \pm 6,49$ s; $p < 0.05$) quando comparado com os não tratados ($15,00 \pm 2,43$ s). Comparados ao grupo controle capsaicina, os animais pré-tratados com α -amirina (10, 30, e 100 mg/kg, v.o.) apresentaram diminuição na resposta “face rubbing” pelo grau de 27, 37, e 44%, enquanto com a β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), a redução foi de 3, 81, e 90% para as respectivas doses. Morfina (5 mg/kg, s.c.) suprimiu o comportamento nociceptivo em 97% (Tabela 1 e Figura 6). Enquanto o efeito de β -amirina alcançou significância estatística ($p < 0,05$) tanto para a dose de 30 quanto para a dose de 100 mg/kg, o efeito de α -amirina foi significativo apenas na dose de 100 mg/kg. Visto que β -amirina demonstrou um maior potencial de atividade antinociceptiva, os estudos subsequentes foram desenvolvidos com esta droga.

A administração de antagonista de receptor da capsaicina (TRPV1), capsazepina (5 mg/kg, i.p.), antagonizou significativamente a resposta inibitória da dor promovida pela β -amirina ($45,33 \pm 2,67$ s) (Figura 7). Morfina (5 mg/kg) exibiu uma potente resposta antinociceptiva (90 %), enquanto que a injeção de baixas doses de naloxona (1 mg/kg, i.p.) como pré-tratamento, reverteu completamente o efeito da morfina ($34,00 \pm 3,21$ s) e de β -amirina na dose de 30 mg/kg ($43,14 \pm 3,86$ s), como mostra a Figura 8. (Tabelas 2 e 3 em apêndice).

Tabela 1. Efeito de α -amirina e de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / via	“Face rubbing” (s)	Inibição %
Controle normal	-	15,00 $\pm$ 2,43	-
Controle capsaicina	-	69,83 $\pm$ 6,49 ^a	-
	10 / v.o.	51,20 $\pm$ 7,25	26,68
α -Amirina	30 / v.o.	43,80 $\pm$ 6,51	37,28
	100 / v.o.	39,00 $\pm$ 4,36 ^b	44,15
	10 / v.o.	67,60 $\pm$ 12,23	3,19
β -Amirina	30 / v.o.	13,14 $\pm$ 8,55 ^b	81,18
	100 / v.o.	6,67 $\pm$ 6,67 ^b	90,45
Morfina	5 / s.c.	2,33 $\pm$ 2,33 ^b	96,66

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de “face rubbing” (coçar ou esfregar o focinho) por um período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: veículo (água destilada + 0,05% Tween 80), α -amirina e β -amirina, v.o., e 30 minutos após o tratamento com morfina, s.c. Foram utilizados 8 animais / grupo.

^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnett).

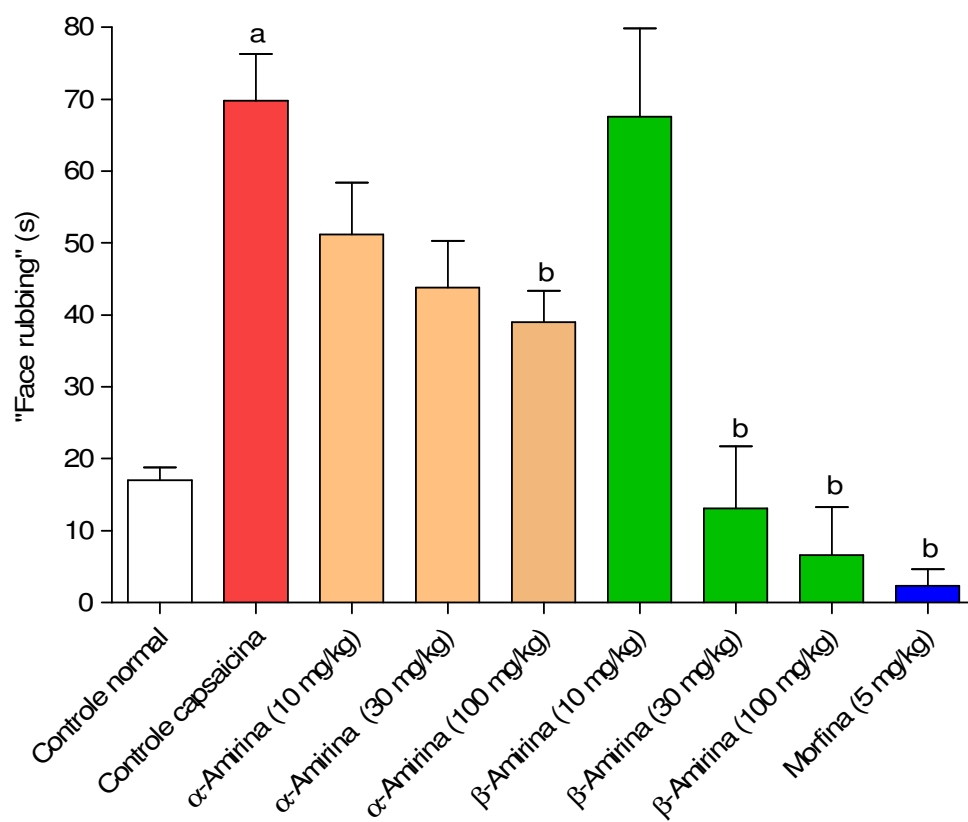


Figura 8. Efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento "face rubbing" (coçar ou esfregar o focinho) por um período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), α -Amirina e β -Amirina (ambos administrados via oral), e 30 minutos após o tratamento com morfina, s.c. Foram utilizados 8 animais / grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina. (ANOVA – uma via, seguido por teste de Dunnett).

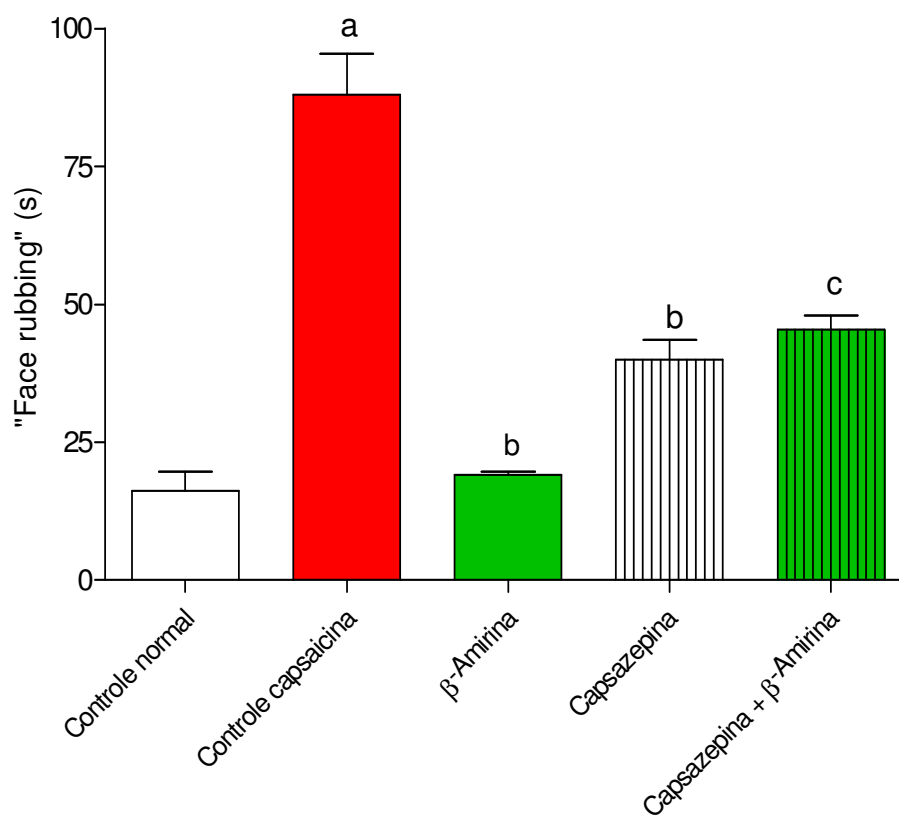


Figura 9. Participação de receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β-amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de “face rubbing” (coçar ou esfregar o focinho) durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 µL, 1.5 µg, s.c.) na vibrissa direita do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle normal e controle capsaicina (ambos: água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β-amirina (30 mg/kg, v.o.). Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β-amirina. O grupo controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) foi analisado nos mesmos parâmetros dos demais, porém não foi submetido à administração de capsaicina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle normal; ^b p<0,05 vs. Controle capsaicina; ^c p<0,05 vs. β-amirina. (ANOVA – uma via, seguido por teste de Tukey).

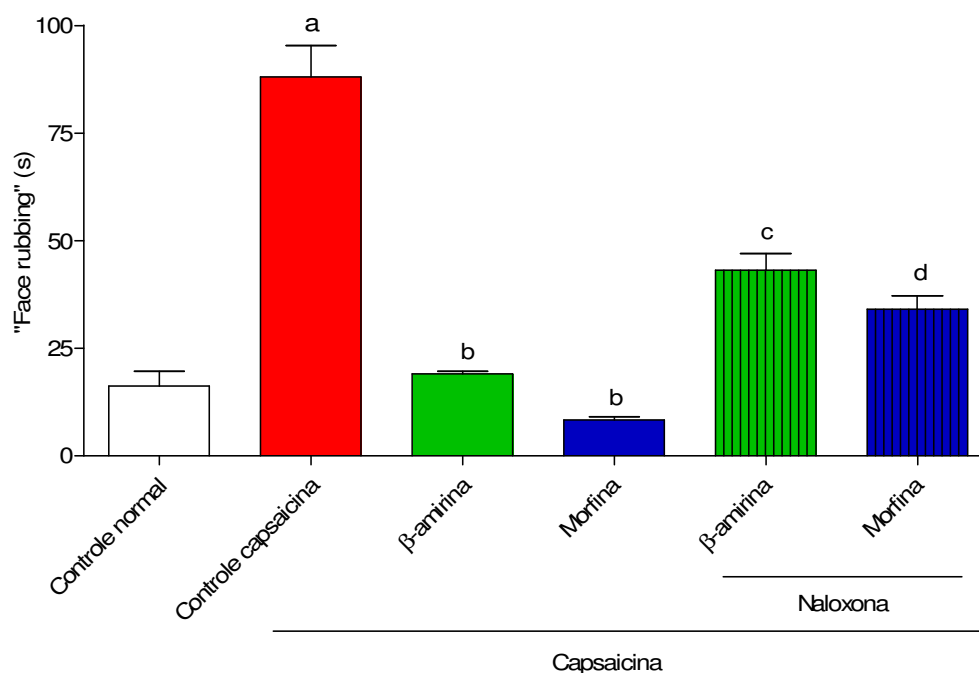


Figura 10. Participação de receptores opióides na ação antinoceptiva de β-Amirina utilizando modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de “face rubbing” (coçar ou esfregar o focinho) durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle normal e controle capsaicina (ambos: água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β-Amirina (30 mg/kg, v.o.) e 30 min antes de morfina (5mg/kg, s.c.). Naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β-Amirina e morfina. O grupo controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) foi analisado nos mesmos parâmetros dos demais, porém não foi submetido à administração de capsaicina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina; ^c $p < 0,05$ vs. β-Amirina e ^d $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

5.2. Estudo do efeito da β -Amirina na termometria cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos

A ação de um agente irritante, como a injeção subcutânea de solução de capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g), provoca no local desta aplicação uma vasodilatação direta e substancial, com aumento da temperatura cutânea local logo nos primeiros minutos, que decresce moderadamente se o estímulo não for contínuo. A captação desta temperatura, na região orofacial (vibrissa), com câmera sensível ao infravermelho, reproduziu uma resposta relacionada diretamente com a diminuição da temperatura e a antinocicepção com β -Amirina.

A diminuição da temperatura captada na região orofacial (vibrissa) foi correlacionada diretamente com a ação antinociceptiva da β -amirina. O comportamento de variação térmica, testado neste modelo de dor orofacial, foi observado, em três repetições:

a) permanecendo as mesmas características: animais tratados com veículo (água destilada + 0,05% de Tween 80) e que sofreram ação do agente algóstico, capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g), aplicado na vibrissa direita, antes desta aplicação não apresentaram variação térmica quando comparados aos animais que também foram tratados com veículo, mais que não receberam a aplicação de capsaicina (média de 2,4°C das três repetições);

b) variação estatística significativa ($p < 0,05$): logo após a aplicação do agente algóstico, o grupo controle capsaicina demonstrou marcadamente aumento da temperatura local (média de 6,67°C das três repetições) com decréscimo gradual após 10 minutos (média de 5,56°C das três repetições) quando comparados com os animais não tratados com capsaicina na vibrissa, controle normal, mais que estiveram nas mesmas condições experimentais (manipulações, ambientação, alimentação, idade, data do teste) que apresentaram variação térmica média de 2,78 e 2,52°C, nos dois momentos seguintes de observação.

O pré-tratamento com β -amirina (30 mg/kg, v.o.) diminuiu significativamente ($p<0,05$) a temperatura na vibrissa no momento da aplicação de capsaicina e 10 minutos após ($1,90\pm0,15$ e $2,27\pm0,23^{\circ}\text{C}$, respectivamente). O grupo morfina foi eficaz na diminuição térmica nos dois momentos ($1,90\pm0,10$ e $1,65\pm0,12^{\circ}\text{C}$). A variação de temperatura está demonstrada como a diferença entre a temperatura máxima e mínima no local da administração de capsaicina, em $^{\circ}\text{C}$, representada na tabela 4.

O pré-tratamento com antagonista não seletivo dos receptores TRPV1, vermelho de Rutênio (2 mg/kg, i.p.) não reverteu o efeito de β -amirina ($3,62\pm0,2$ e $2,60\pm0,2^{\circ}\text{C}$) na observação da variação térmica (Tabela 4 e Figura 9). A resposta na variação térmica pelo vermelho de rutênio apresentou significativa diminuição ($4,02\pm0,17$ e $3,23\pm0,37^{\circ}\text{C}$) quando comparado ao controle capsaicina ($7,77\pm0,6$ e $5,54\pm0,1^{\circ}\text{C}$).

A morfina (5 mg/kg), administrada ao grupo controle positivo, promoveu uma diminuição da temperatura média observada (55%), efeito completamente abolido pela co-administração do antagonista opióide naloxona (1 mg/kg, i.p.). De forma semelhante, a β -amirina também teve seus efeitos revertidos pela co-administração de naloxona ($4,25\pm0,22$ e $3,70\pm0,11^{\circ}\text{C}$) (Tabela 5 e Figura 10).

Na tabela 6 observamos a participação do óxido nítrico, analisada pela ação de L-NAME (20 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de óxido nítrico, quando aplicado previamente no grupo β -amirina, a resposta da atividade antinoceptiva foi revertida nos três momentos de observação ($8,17\pm0,32$; $7,40\pm0,21$ e $8,10\pm0,17^{\circ}\text{C}$), com significância $p<0,05$. Na presença de capsaicina, β -amirina, neste teste, apresentou resposta antinoceptiva de $5,70\pm0,5^{\circ}\text{C}$ antes mesmo da aplicação de capsaicina, $6,70\pm0,06^{\circ}\text{C}$ logo após a administração desta na vibrissa e $6,23\pm0,14^{\circ}\text{C}$ dez minutos após essa aplicação quando comparadas ao grupo controle capsaicina nesses momentos de observação, com diferença significativa ($p<0,05$). A Figura 11 representa essa resposta graficamente.

Tabela 4. Estudo do efeito de β -Amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: papel dos receptores TRPV1.

Tempo (min)	Controle normal	Controle capsaicina	β -Amirina (30 mg/kg, v.o)	Vermelho de rutênio (2 mg/kg, i.p.)	Vermelho de rutênio + β -Amirina
-2,5 (sem capsaicina)	2,35 $\pm$ 0,1	2,47 $\pm$ 0,1	2,20 $\pm$ 0,1	2,34 $\pm$ 0,10	2,34 $\pm$ 0,1
0	3,35 $\pm$ 0,1	7,77 $\pm$ 0,6 ^a	4,60 $\pm$ 0,3 ^b	4,02 $\pm$ 0,17 ^b	3,62 $\pm$ 0,2
2,5	2,47 $\pm$ 0,1	6,02 $\pm$ 0,2 ^a	3,67 $\pm$ 0,2 ^b	3,97 $\pm$ 0,77 ^b	3,60 $\pm$ 0,2
5,0	3,07 $\pm$ 0,3	6,02 $\pm$ 0,3 ^a	3,50 $\pm$ 0,3 ^b	3,30 $\pm$ 0,15 ^b	3,55 $\pm$ 0,3
7,5	2,66 $\pm$ 0,2	5,44 $\pm$ 0,2 ^a	3,77 $\pm$ 0,4 ^b	3,28 $\pm$ 0,32 ^b	3,03 $\pm$ 0,9
10,0	2,77 $\pm$ 0,2	5,54 $\pm$ 0,1 ^a	2,77 $\pm$ 0,2	3,23 $\pm$ 0,37 ^b	2,60 $\pm$ 0,2

A diferença de temperatura foi determinada pela diferença entre a temperatura máxima e a mínima, detectadas por termometria, com equipamento próprio, durante 10 minutos, nos intervalos de -2.5 minutos antes, 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 minutos após a administração da capsaicina na vibrissa direita do animal. Tanto o grupo controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80), em todos os tempos analisados, como o tempo -2,5 para os demais grupos, não foram tratados com capsaicina. β -Amirina (30 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, s.c.) foram administrados 60 e 30 minutos antes da administração de capsaicina. Vermelho de rutênio (2 mg/kg, i.p.) foi aplicado 15 minutos antes de β -amirina e capsaicina. Os resultados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina. (ANOVA – uma via, seguido por teste de Tukey).

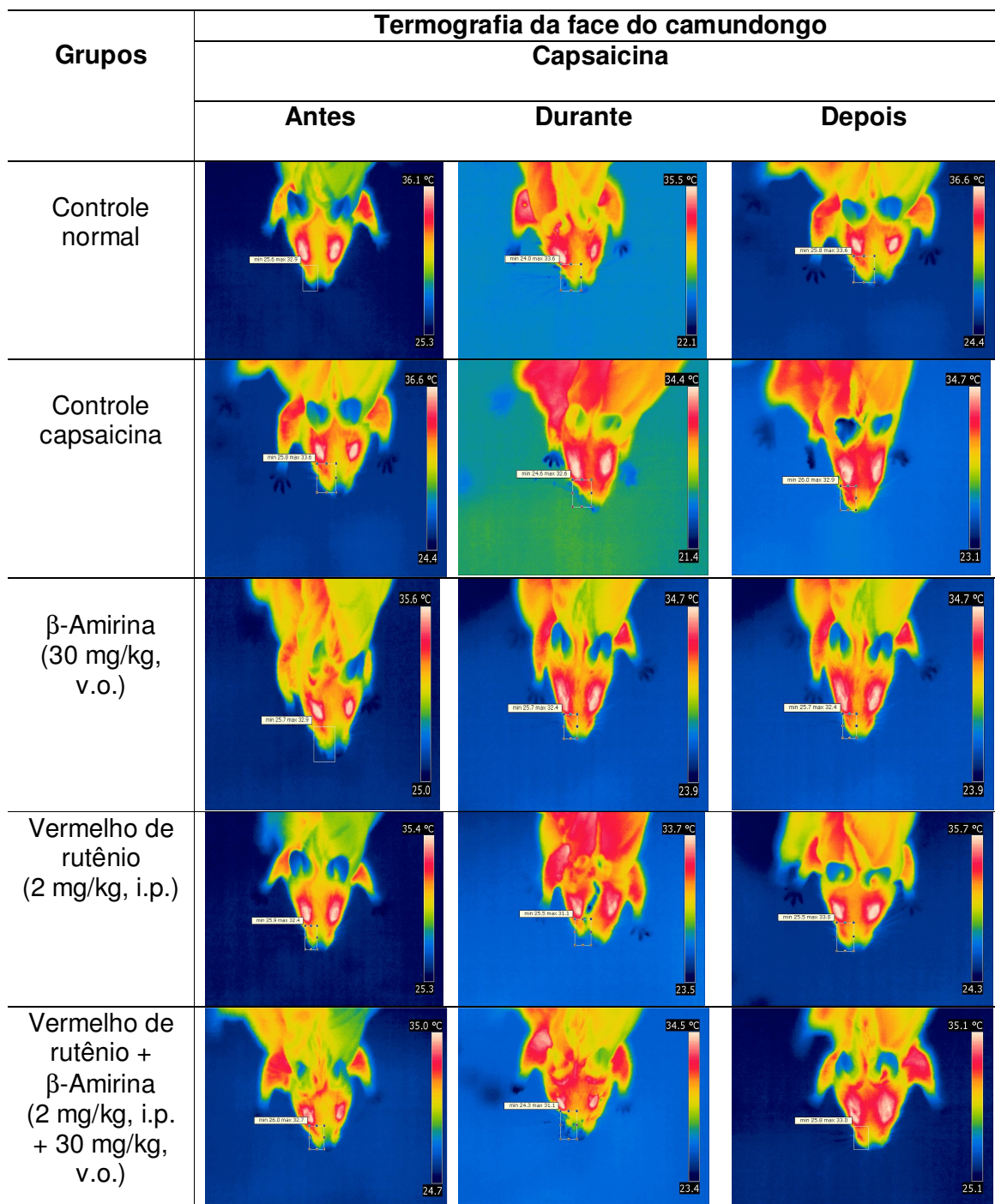


Figura 11. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de receptores TRPV1. O retângulo indica o local de administração e de maior variação térmica.

Tabela 5. Estudo do efeito de β -amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: papel dos receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	Diferença de Temperatura (°C)		
		Capsaicina		
		Antes	Durante	Depois
Controle normal	-	2,35±0,12	2,22±0,10	2,27±0,29
Controle capsaicina	-	2,47±0,31	4,20±0,46 ^a	3,25±0,06
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	2,20±0,11	1,90±0,15 ^b	2,27±0,23
Morfina	5 mg/kg / s.c.	2,50±0,50	1,90±0,10 ^b	1,65±0,12 ^b
Naloxona + β -Amirina	1 mg/kg / i.p. + 30 mg/kg / v.o.	2,22±0,08	4,25±0,22 ^c	3,70±0,11
Naloxona + Morfina	1 mg/kg / i.p. + 5 mg/kg / s.c.	2,07±0,60	4,10±0,15 ^d	3,07±0,13 ^d

A análise da temperatura, em °C, foi determinada pela diferença entre a temperatura máxima e a mínima, detectadas por termometria, com equipamento próprio, 10 minutos antes, no momento da administração e 10 minutos após a administração da capsaicina na vibrissa direita do animal. O controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80) não recebeu o tratamento com capsaicina. β -Amirina e morfina foram administradas 60 e 30 minutos, respectivamente, antes da administração de capsaicina. A naloxona foi aplicada 15 minutos antes de β -amirina e morfina. Os resultados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina; ^c $p < 0,05$ vs. β -Amirina e ^d $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

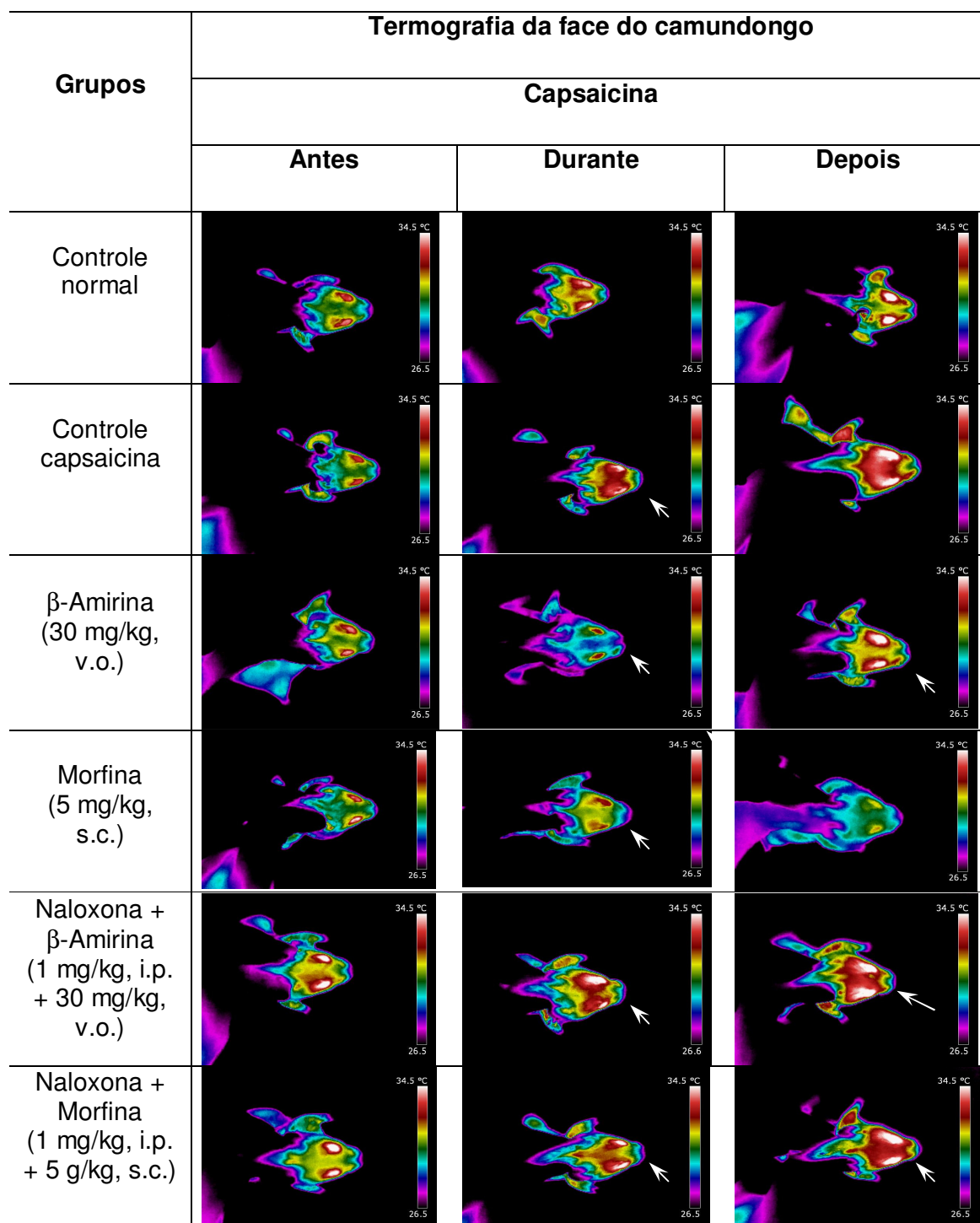


Figura 12. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de mecanismo opióide. A seta indica o local de maior variação térmica.

Tabela 6. Estudo do efeito de β -amirina na termografia cutânea após injeção orofacial de capsaicina em camundongos: participação da via do óxido nítrico.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	Diferença de Temperatura (°C)		
		Capsaicina		
		Antes	Durante	Depois
Controle normal	-	2,35±0,12	2,22±0,10	2,27±0,29
Controle capsaicina	-	7,27±0,03 ^a	8,03±0,22 ^a	7,90±0,15 ^a
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	5,70±0,15 ^b	6,70±0,06 ^b	6,23±0,15 ^b
L-NAME	20 mg/kg / i.p.	7,37±0,35 ^a	8,07±0,80 ^a	7,90±0,63 ^a
L-NAME + β -Amirina	20 mg/kg / i.p. + 30 mg/kg / v.o.	8,17±0,32 ^c	7,40±0,21 ^c	8,10±0,17 ^c

A diferença de temperatura foi determinada pela diferença entre a temperatura máxima e a mínima, detectadas por termometria, com equipamento próprio, 10 minutos antes, 0 e 10 minutos após a administração da capsaicina na vibrissa direita do animal. β -Amirina foi administrada 60 minutos antes da administração de capsaicina. L-NAME foi aplicado 15 minutos antes de β -Amirina e capsaicina. Os resultados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle capsaicina; ^c $p < 0,05$ vs. β -Amirina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

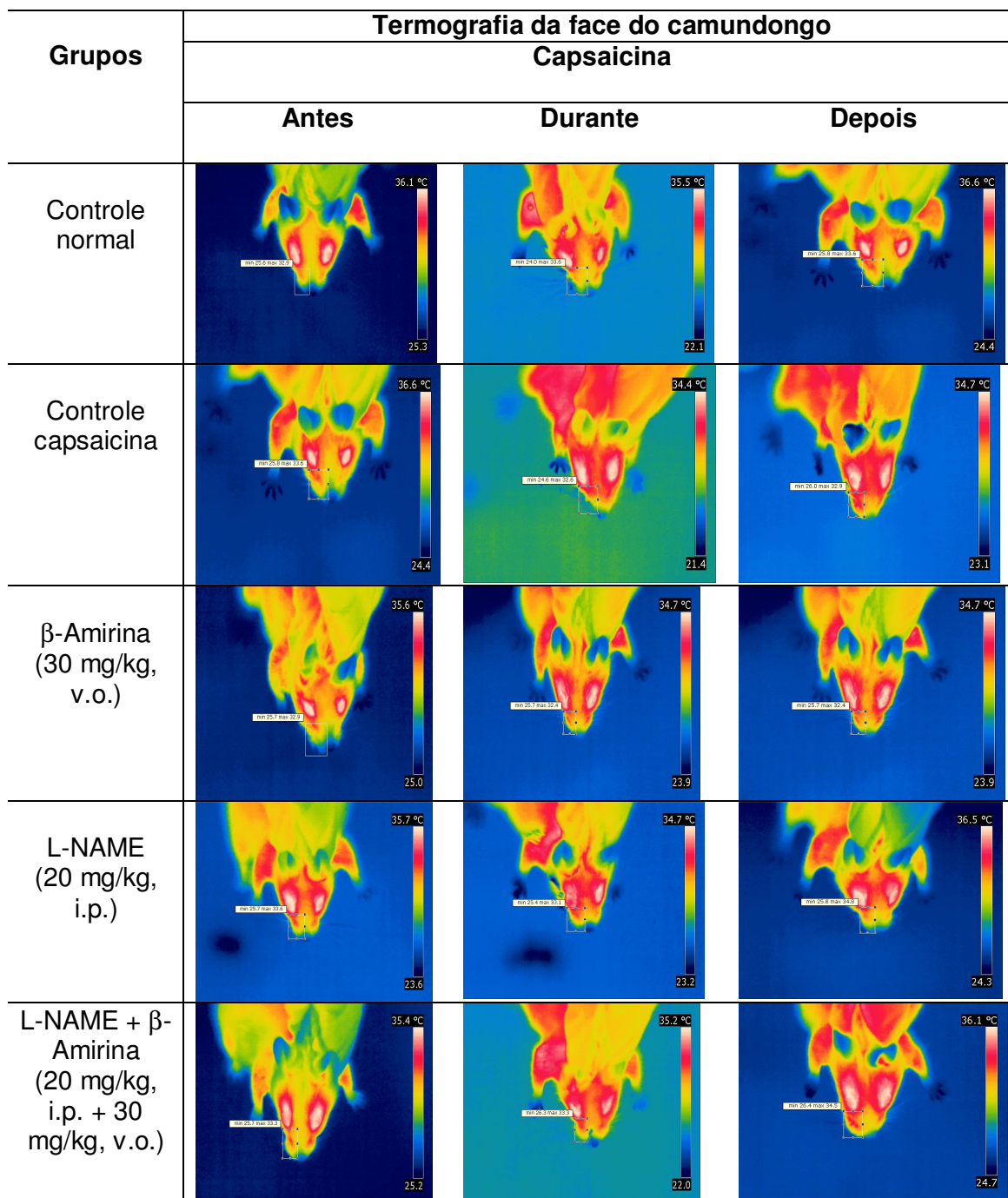


Figura 13. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade na face de camundongos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de óxido nítrico. O retângulo indica o local de administração e de maior variação térmica.

5.3. Nociceção ocular induzida por capsaicina: “Eye wiping test”

A capsaicina aplicada diretamente no olho apresentou efeito irritante no teste de limpeza da conjuntiva de cobaia logo após esta aplicação (FARAZIFARD *et al*, 2005). Em nosso laboratório, essa resposta também foi confirmada com a aplicação local de capsaicina (20 μ L, 1,5 μ g) no olho direito de camundongos com resposta de $43,00 \pm 2,70$ s/10 min “coçando” o olho quando comparamos com o comportamento de animais normais, sem a ação deste estímulo que “coçam” o olho em média 7,0 s/10 min (dados obtidos em teste piloto).

A Figura 12 apresenta os resultados da diminuição da nociceção pela β -amirina, na nociceção ocular induzida por capsaicina, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg: as respostas antinociceptivas apresentam significância estatística (22, 48, 63 e 60%, respectivamente) em relação ao grupo controle capsaicina.

A participação dos receptores opióides, neste modelo, foi observada pela ação reversora da naloxona nos grupos β -amirina ($60,60 \pm 5,02$ segundos) e morfina ($33,50 \pm 3,75$ segundos) quando comparadas com o efeito antinociceptivo destes grupos ($16,00 \pm 0,58$ e $7,25 \pm 0,48$ segundos). O grupo controle deste teste apresentou resposta de $54,50 \pm 4,05$ segundos. (Figura 13)

A participação dos receptores TRPV1 (Figura 14), é observada com a inibição do efeito antinoceptivo de β -amirina ($51,60 \pm 0,51$ s) quando se administra previamente capsazepina. O grupo β -amirina ($16,00 \pm 0,58$ s), que não foi pré-tratado com capsazepina, apresentou atividade protetora significativa $p < 0,01$. O grupo controle teve tempo de resposta de $43,00 \pm 2,70$ s.

Os dados estatísticos detalhados deste modelo estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, em apêndice.

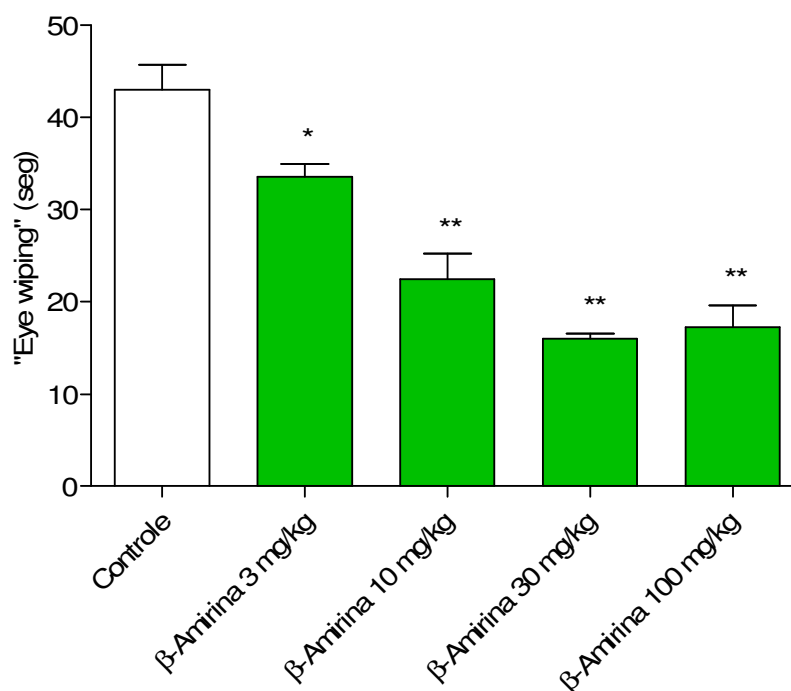


Figura 14. Estudo da ação de β-Amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μL, 1.5 μg, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β-amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. Controle (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnett).

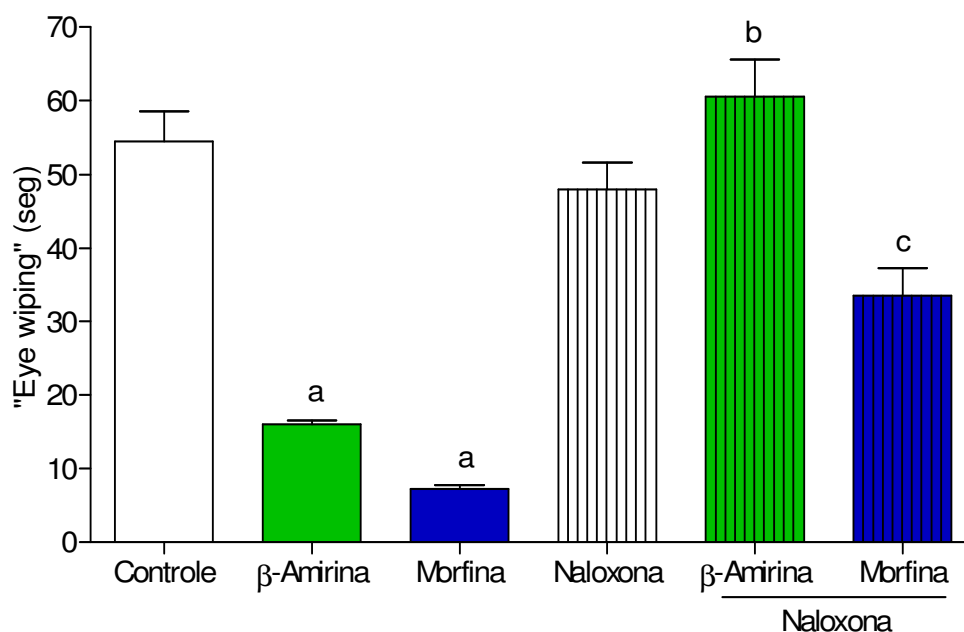


Figura 15. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (30 mg/kg, v.o.) e 30 minutos após morfina (5 mg/kg, s.c.). A naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -Amirina e ^c $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

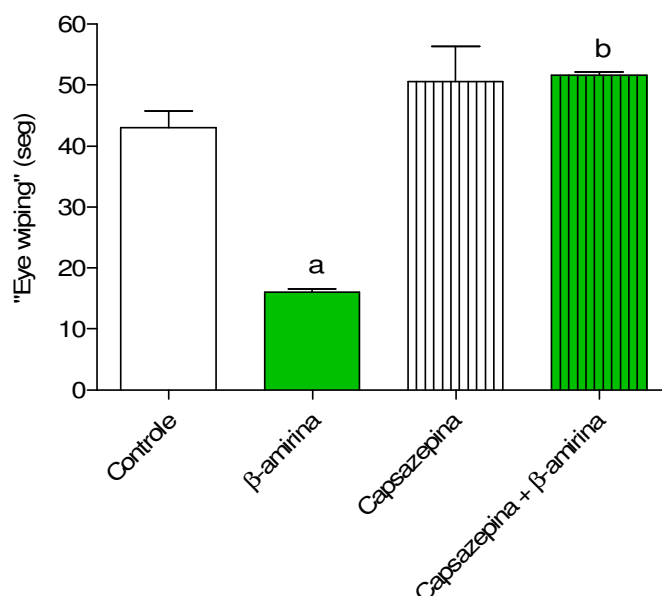


Figura 16. Participação dos receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “Eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (30 mg/kg, v.o.). A capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle; ^b p<0,05 vs. β -Amirina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

5.4. Avaliação do efeito da β -amirina em animais diabéticos no teste da dor orofacial induzida por capsaicina

Após 4 semanas da indução de diabetes por aloxano, os animais que apresentaram níveis glicêmicos acima de 240 mg/dL em pelo menos mais de duas avaliações (que foram realizadas 72 horas, 3 semanas e 4 semanas após indução pelo aloxano) foram selecionados para os testes.

O estudo com animais diabéticos no modelo de dor orofacial apresentou algumas particularidades, que estão representadas na figura 15:

a) quando comparamos os grupos controle normal e controle diabético, a resposta à dor permaneceu a mesma, sem diferenças estatísticas significantes ($43,00 \pm 2,48$ e $48,00 \pm 2,48$ s, respectivamente);

b) o grupo tratado com o triterpeno β -amirina, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a resposta nociceptiva induzida por capsaicina nas doses de 30 e 100 mg/kg ($14,60 \pm 2,29$ e $15,50 \pm 5,11$ s, respectivamente) quando comparado estes resultados com os grupos controle diabético;

c) o grupo controle morfina reduziu significativamente ($1,25 \pm 0,25$ s) a resposta à dor em relação ao controle capsaicina.

A figura 15 também mostra graficamente que no estudo da participação de receptores opióides, não foram observadas respostas com significância estatística, em animais diabéticos, nos grupos pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.): β -amirina 30 mg/kg ($6,50 \pm 3,17$ s) e morfina ($18,75 \pm 8,18$ s) em comparação àqueles não pré-tratados com naloxona: β -amirina 30 mg/kg ($14,60 \pm 2,29$ s) e morfina ($1,25 \pm 0,25$ s). (Tabela 10, em apêndice)

Na figura 16 observa-se a resposta do envolvimento de receptores TRPV1 em animais diabéticos: o grupo β -amirina pré-tratado com capsazepina não apresentou

reversão significativa de resposta antinoceptiva ($16,67 \pm 5,70$ s) comparado ao grupo β -amirina ($14,60 \pm 2,29$ s).

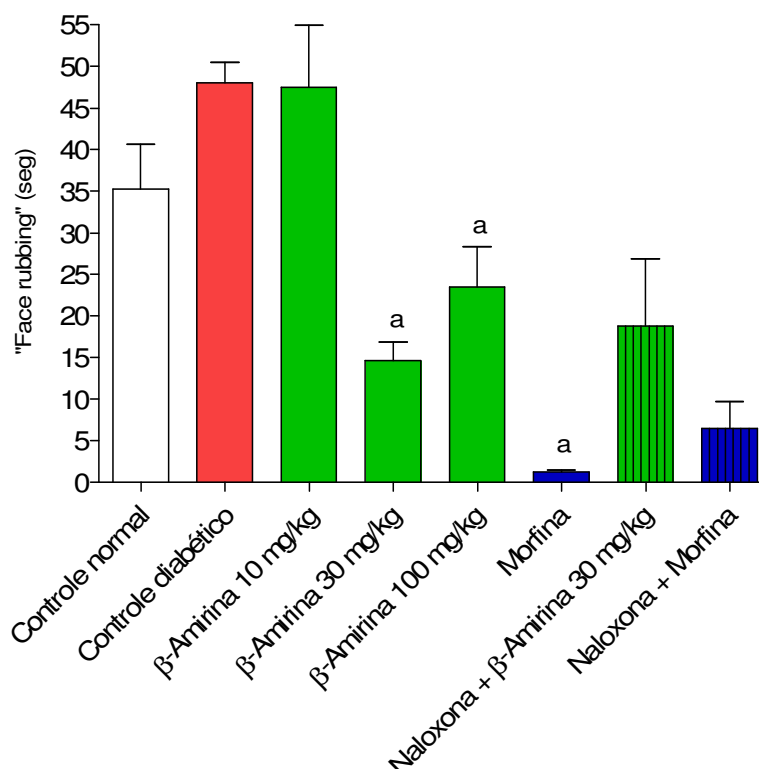


Figura 17. Efeito de β -Amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: participação de receptores opióides. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de coçar a face e/ou focinho durante 10 minutos após a administração da capsaicina ($20 \mu\text{L}$, $1.5 \mu\text{g}$, s.c.) na vibrissa direita do animal diabético. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina 30 mg/kg e morfina. Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle diabético (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

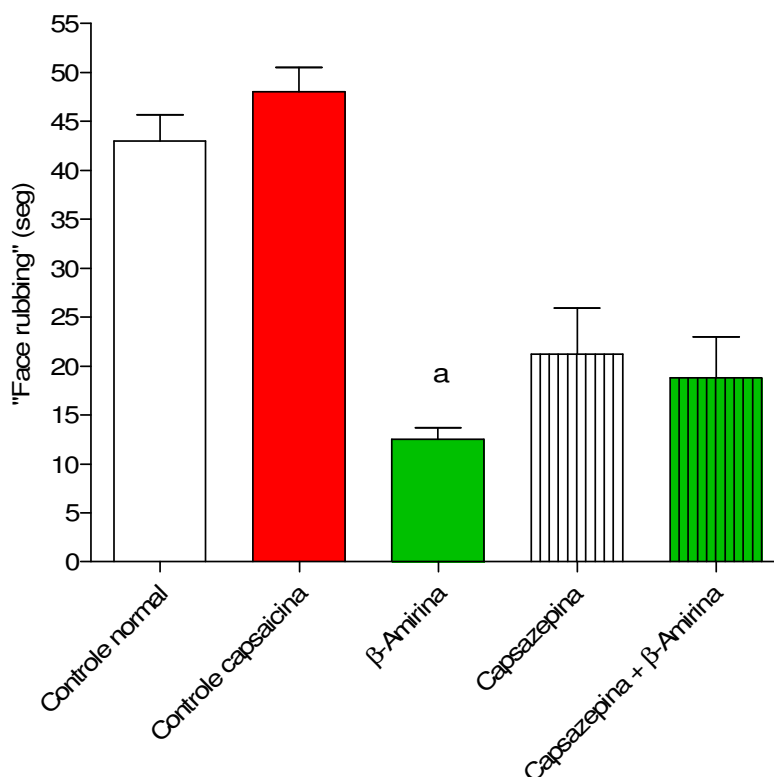


Figura 18. Efeito de β -amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: participação de receptores TRPV1. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de coçar a face e/ou focinho durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal diabético. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina 30 mg/kg e morfina. Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle diabético. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

5.4.2. Efeito da β -amirina sobre a resposta térmica no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos

Apesar da pesquisa da variação térmica ter apresentado resposta no modelo de dor orofacial em camundongos normais (item 5.2), o mesmo comportamento não foi observado em camundongos diabéticos, induzidos por aloxano:

A análise estatística, ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey, não indicou diferença estatística ($p < 0,05$) na pesquisa de variação de temperatura nos grupos analisados, em animais diabéticos. As tabelas 11 e 12 e as figuras 18 e 19 apresentam os dados referentes à pesquisa envolvendo receptores TRPV1 e a pesquisa do envolvimento da via do óxido nítrico.

Tabela 11. Análise da variação de temperatura local, em °C por termometria, no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos: Participação de receptores TRPV1.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	Variação de temperatura °C (Média ±E.P.M.)		
		Capsaicina		
		Antes	Durante	Depois
Controle normal	-	7.27±0.03	8.03±.22	7.90±0.15
Controle diabético	-	6.50±0.25	7.63±0.47	6.97±0.35
β-Amirina	30 mg/kg / v.o.	7.13±0.67	9.65±0.15	7.40±0.61
Vermelho de Rutênio	2 mg/kg / i.p.	7.40±0.95	9.87±0.47	7.03±0.39
Vermelho de Rutênio + β-Amirina	2 mg/kg, i.p. + 30 mg/kg / v.o.	7.10±0.55	7.50±0.78	7.20±0.60

A diferença de temperatura foi determinada pela diferença entre a temperatura máxima e a mínima, detectadas por termometria, com equipamento próprio, 10 minutos antes, 0 e 10 minutos após a administração da capsaicina (20 µL, 1.5 µg, s.c.) na vibrissa direita do animal. β-amirina foi administrada 60 minutos antes da administração de capsaicina. Vermelho de rutênio foi aplicado 15 minutos antes de β-amirina e capsaicina. Os resultados estão expressos em média ±E.P.M. Não houve variação estatística significativa entre os grupos. (ANOVA – uma via, seguido pelo Testes de Tukey).

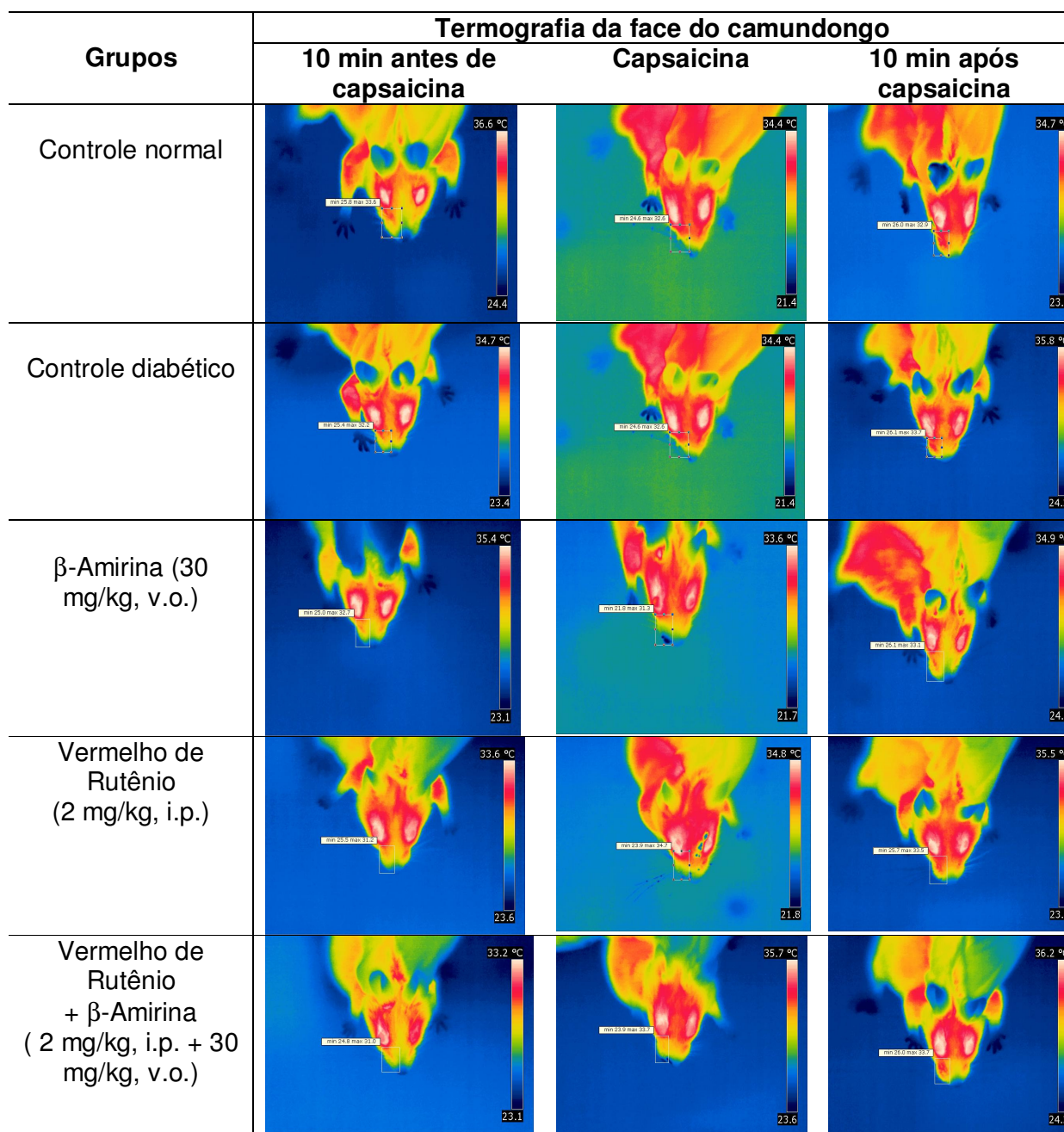


Figura 19. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade de β -amirina na face de camundongos diabéticos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de TRPV. O retângulo indica o local de administração e de maior variação térmica.

Tabela 12. Análise da variação de temperatura local, em °C por termometria, no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina em camundongos diabéticos: participação da via do óxido nítrico.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	Variação de temperatura °C (Média ±E.P.M.)		
		Capsaicina		
		Antes	Antes	Antes
Controle normal	-	7.27±0.03	8.03±.22	7.90±0.15
Controle diabético	-	6.50±0.25	7.63±0.47	6.97±0.35
β-Amirina	30 mg/kg / v.o.	7.13±0.67	9.65±0.15	7.40±0.61
L-NAME	20 mg/kg / i.p.	7.43±0.45	6.33±0.65	7.23±0.26
L-NAME +	20 mg/kg, i.p. +	7.30±0.23	8.35±0.25	7.10±0.30
β-Amirina	30 mg/kg / v.o.			

A diferença de temperatura foi determinada pela diferença entre a temperatura máxima e a mínima, detectadas por termometria, com equipamento próprio, durante 10 minutos, nos intervalos de -2.5 minutos antes, 0; 2.5; 5.0; 7.5 e 10 minutos após a administração da capsaicina na vibrissa direita do animal. β-Amirina foi administrada 60 minutos antes da administração de capsaicina. L-NAME (20 mg/kg, i.p) foi aplicado 15 minutos antes de β-amirina e capsaicina. Os resultados estão expressos em média ±E.P.M. Não houve variação estatística significativa entre os grupos. (ANOVA – uma via, seguido pelo Testes de Bonferroni).

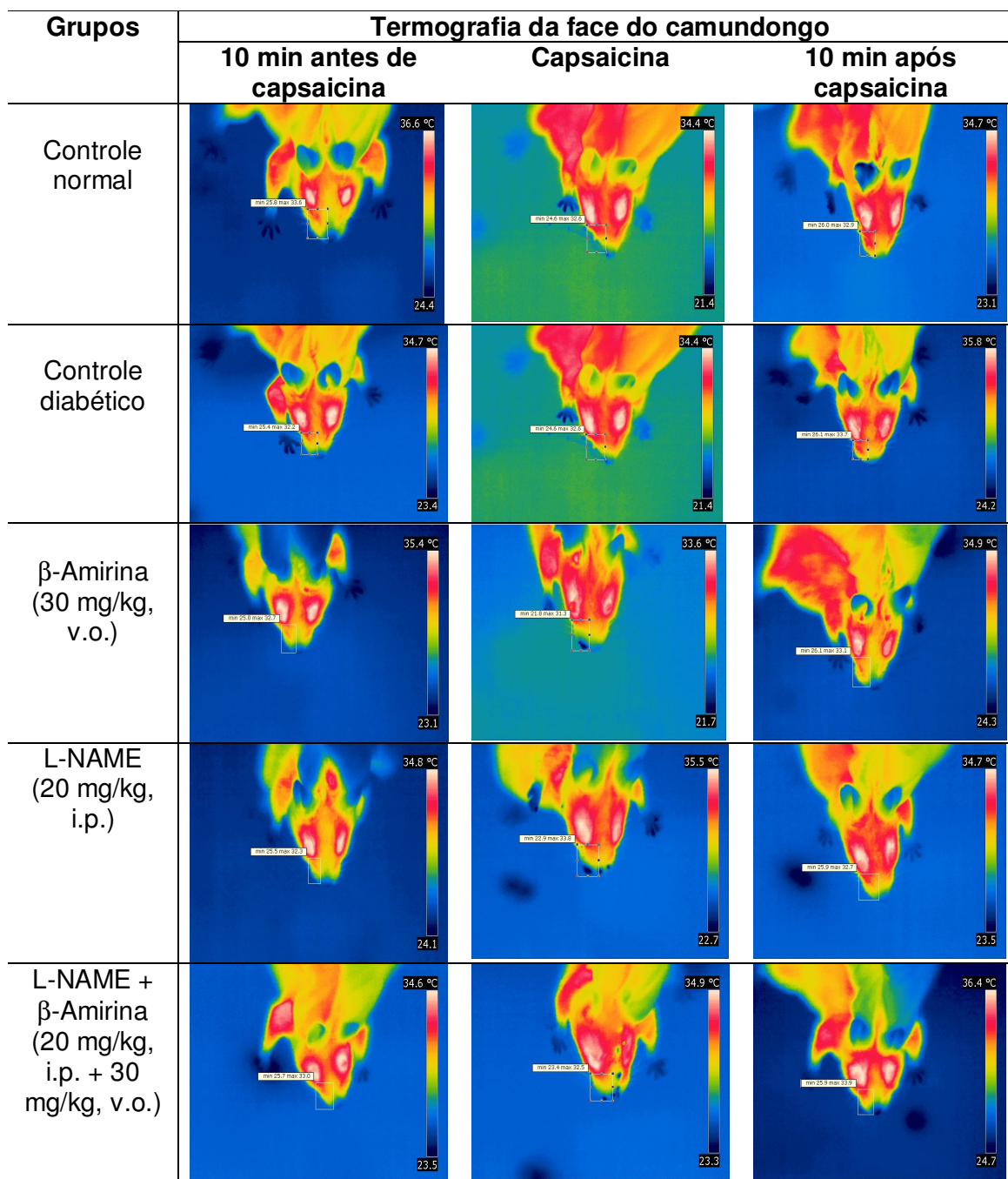


Figura 20. Termometria cutânea infravermelha de alta sensibilidade de β -amirina na face de camundongos diabéticos submetidos ao modelo de dor orofacial induzida por capsaicina com a participação de óxido nítrico. O retângulo indica o local de administração e de maior variação térmica.

5.4.3. Avaliação do efeito da β -amirina no teste da imersão de cauda em animais diabéticos

O efeito de β -amirina no modelo de dor pela imersão da cauda de camundongos diabéticos aumentou o tempo de reação ao estímulo térmico, nas doses de 30 e de 100 mg/kg, após 60 minutos da administração (85 e 78 %, respectivamente), 90 minutos após (93 e 84 %, respectivamente) e a dose de 100 mg/kg após 120 minutos da administração (84 %).

O grupo tratado com morfina apresentou aumento no tempo de resposta ao estímulo já nos primeiros 30 minutos de sua administração (88 %) e perdurou em 60, 90 e 120 minutos após esta administração (100%).

Conforme apresentado no item 5.2, os grupos controle normal e controle diabético não apresentaram diferença estatística significativa entre si em qualquer tempo de observação neste modelo. (Tabela 13).

O envolvimento de receptores opióides foi observado nos grupos pré-tratados com naloxona, pela diminuição do tempo de reação, já aos 30 minutos após a administração de β -amirina ($3,33 \pm 0,67$ s) e morfina ($4,75 \pm 0,85$ s). (Tabela 13).

Tabela 13. Efeito de β -amirina no modelo de dor pela imersão da cauda, em camundongos diabéticos: participação de receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de resposta (s)				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
	Após adm. das drogas testes					
Controle normal	-	1,57±0,20	2,29±0,36	2,00±0,71	3,00±0,71	3,75±1,03
Controle diabético	-	3,80±0,37	3,00±0,63	3,50±0,64	4,80±0,37	5,57±0,37
β-Amirina	10	3,50±1,09	2,67±0,67	5,83±0,31	7,50±0,64	6,50±0,87
	30	4,33±0,95	4,00±0,77	8,50±0,81 ^a	9,33±0,67 ^a	8,25±1,18
	100	4,33±1,05	3,50±0,67	7,80±1,59 ^a	8,40±0,68 ^a	8,40±0,51 ^a
Morfina	5	4,83±0,31	8,80±0,80 ^a	10,00±0,0 ^a	10,00±0,0 ^a	10,00±0,0 ^a
Naloxona + β-Amirina	1 + 30	5,00±0,31	3,33±0,67 ^c	4,20±0,73 ^c	4,83±0,87 ^c	5,60±1,08
Naloxona + Morfina	1 + 5	4,83±0,61	4,75±0,85 ^c	5,80±0,58 ^c	7,75±0,63	8,00±0,44

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de resposta a exposição de calor na cauda, representado pelo sacudir ou retirar a cauda imersa em banho – Maria, à $52 \pm 0,5^\circ\text{C}$, nos intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração das substâncias testadas. Os grupos testes foram: controle normal e controle diabético (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). A naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle diabético; ^b $p < 0,05$ vs. Morfina ou β -amirina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

5.5. Avaliação do efeito da β -amirina no teste da imersão de cauda, em camundongos normais

O estudo da resposta à nocicepção pela imersão de cauda apresentou como média de resposta da retirada da cauda no grupo controle de 2,95 segundos quando submetido ao banho de água à 52°C em todos os momentos de observação deste modelo. (Tabela 14)

O triterpeno β -amirina nas doses de 10 e 30 mg/kg aumentou de forma significativa ($p<0,05$) o tempo de resposta ao calor, no modelo da imersão da cauda, no tempo de 60 minutos da administração ($6,00\pm1,53$ e $7,50\pm0,50$ s, respectivamente); a dose de 10 mg/kg manteve a resposta até o final do experimento; morfina (5 mg/kg) diminuiu a resposta nociceptiva neste modelo a partir de 30 minutos da administração ($10,00\pm0,00$ s) mantendo esta resposta até 120 minutos.

A participação dos receptores opióides foi observada com a reversão da resposta de β -amirina quando pré-tratada com naloxona (1 mg/kg) com significância estatística ($p<0,05$) após 60 minutos ($2,50\pm0,50$ s) da administração. A resposta antinoceptiva opióide foi antagonizada significativamente após 90 minutos da dose de morfina ($4,25\pm0,48$ s) e mantida até os 120 minutos ($6,50\pm0,29$ s) da administração. (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito de β -amirina no modelo de dor pela imersão da cauda, em camundongos: participação de receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de resposta (s)				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
		Após adm. das drogas testes				
Controle	-	3,50±0,29	2,50±0,64	2,00±0,71	3,00±0,71	3,75±1,03
	10	5,00±0,58	4,67±0,67	6,00±1,53 ^a	7,00±0,58 ^a	7,33±0,67 ^a
β-Amirina	30	4,50±0,50	5,50±0,50	7,50±0,50 ^a	4,50±0,50	3,00±0,00
	100	4,00±0,00	5,33±0,88	4,33±0,67	4,67±0,67	3,33±0,88
Morfina	5	2,33±0,33	10,00±0,00 ^a	10,00±0,0 ^a	10,00±0,0 ^a	10,00±0,0 ^a
Naloxona + β-Amirina	1 + 30	3,57±0,50	4,50±0,50	2,50±0,50 ^b	3,00±1,00	3,00±1,00
Naloxona + Morfina	1 + 5	2,67±0,33	7,00±0,00	7,00±0,00	4,25±0,48 ^c	6,50±0,29 ^c

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de resposta a exposição de calor na cauda, representado pelo sacudir ou retirar a cauda imersa em banho – Maria, à 52°C $\pm$ 0,5, nos intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração das substâncias testadas. Os grupos testes foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). A naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle; ^b p<0,05 vs. β -Amirina e ^c p<0,05 vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).

5.6. Nocicepção orofacial induzida por formalina

5.6.1. Avaliação do efeito de β -Amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina

O efeito do triterpeno β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina foi estudado com as doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg. Na primeira fase, essas doses diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a resposta ao estímulo doloroso da formalina (21, 46, 42 e 65 %, respectivamente), na segunda fase foi mantida essa atividade antinociceptiva significativa nas mesmas doses estudadas (31, 36, 70 e 51 %, respectivamente), em comparação ao grupo controle negativo. A resposta do controle positivo, morfina, na primeira (96 %) e na segunda fase (98 %) diminuiu completamente a resposta álgica. (Figura 21; dados numéricos expressos na Tabela 15, em apêndice).

O estudo da combinação de DE50 de β -amirina + morfina (30 + 5 mg/kg) e a diminuição dessas doses em 50 e 25% de DE50, apresentou respostas relativas à antinocicepção, com significância estatística ($p < 0,05$), tanto na primeira fase do teste (95, 95 e 72 %, respectivamente), como na segunda fase (90, 98 e 97 %, respectivamente), em relação ao grupo controle. (Tabela 16 e Figura 22).

O pré-tratamento com naloxona, antagonista opióide, reverteu a resposta antinociceptiva de maneira significativa nas duas fases, nos grupos β -amirina, β -amirina + morfina e o controle positivo morfina. (Tabela 16 e Figura 22).

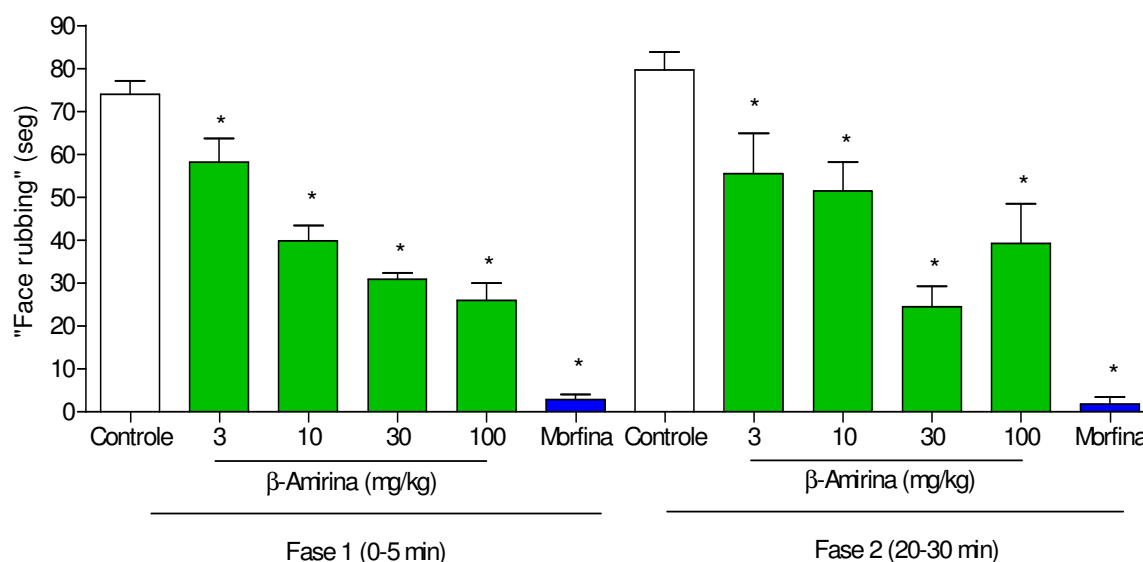


Figura 21. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1ª fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2ª Fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 60 minutos dos tratamentos com as doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg de β -amirina, via oral. Um grupo controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) foi utilizado como controle negativo e, como controle positivo, o grupo morfina (5 mg/kg, s.c.) também foi introduzido. Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnet).

Tabela 16. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: Análise de efeito cumulativo da associação de β -amirina e morfina e participação dos receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	“Face rubbing” (s)	
		1 ^a Fase (0-5 min)	2 ^a Fase (20-30 min)
Controle	-	92,75±6,16	96,88±9,96
β -Amirina	30	24,67±3,18 ^a	36,33±12,47 ^a
β -Amirina + Morfina	30 + 5	4,33±1,89 ^a	1,85±1,07 ^a
Morfina	5	10,00±4,51 ^a	3,40±2,44 ^a
Naloxona + β -Amirina	1 + 30	68,71±4,12 ^b	101,2±13,62 ^b
Naloxona + (β -Amirina + Morfina)	1 + (30 + 5)	87,00±6,80 ^c	86,45±11,08 ^c
Naloxona + Morfina	1 + 5	80,89±5,09 ^d	76,00±10,24 ^d

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1^a fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2^a fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 60 minutos dos tratamentos com β -amirina (30 mg/kg, v.o.) e controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v. o.) e 30 minutos após o grupo morfina (5 mg/kg, s.c.). Um grupo com a associação de β -amirina + morfina também foi usado (morfina foi administrada após 30 minutos da β -amirina e 30 minutos depois, a formalina foi aplicada na vibrissa do animal). O antagonismo opióide foi estudado com o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle; ^b p<0,05 vs. β -Amirina; ^c p<0,05 vs. β -Amirina + Morfina e ^d p<0,05 vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

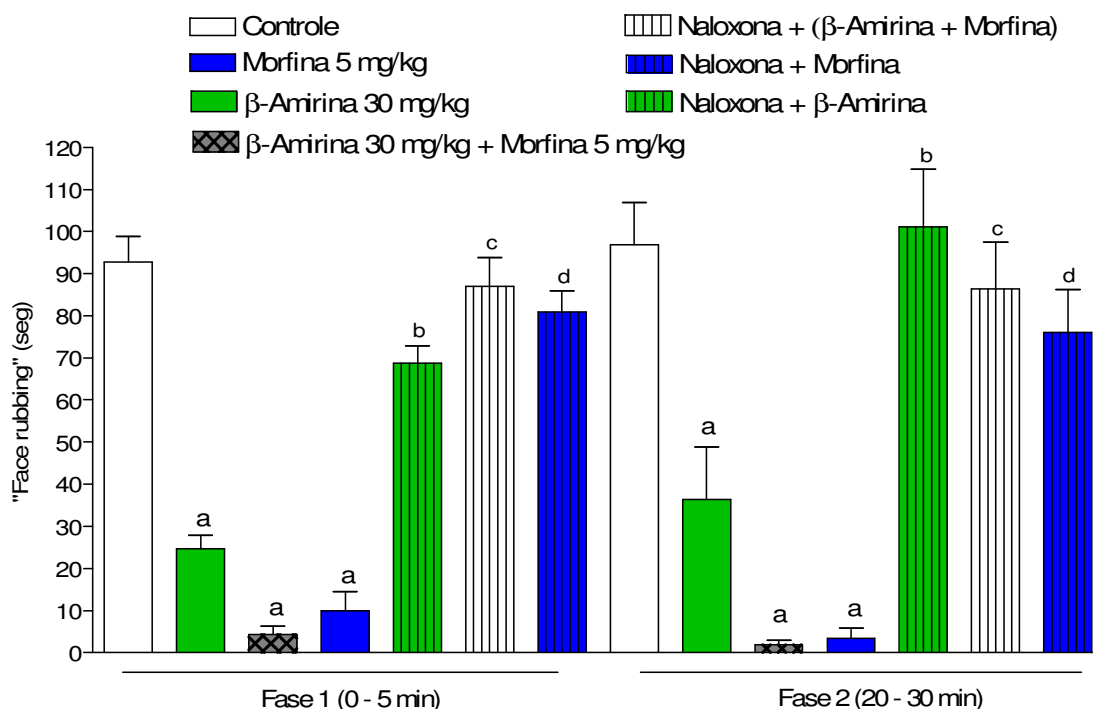


Figura 22. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: análise de efeito cumulativo da associação de β -amirina + morfina e participação dos receptores opióides. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1ª fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2ª fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 60 minutos dos tratamentos com β -amirina (30 mg/kg, v.o.) e controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v. o.) e 30 minutos após o grupo morfina (5 mg/kg, s.c.). Um grupo com a associação de β -amirina e morfina também foi usado (morfina foi administrada após 30 minutos da β -amirina e 30 minutos depois, a formalina foi aplicada na vibrissa do animal). O antagonismo opióide foi estudado, pré-tratando-se 15 minutos antes da dose de cada grupo, com naloxona (2 mg/kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -Amirina; ^c $p < 0,05$ vs. β -Amirina + Morfina e ^d $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

5.6.2. Avaliação de dose-resposta de morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina

A morfina, nas doses de 2,5; 5 e 7 mg/kg, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o comportamento nociceptivo induzido pela administração orofacial de formalina, na primeira (47, 85 e 97 %, respectivamente) e segunda fase (64, 91 e 98 %, respectivamente) em relação ao grupo controle (Figura 23; dados numéricos expressos na Tabela 17, em apêndice).

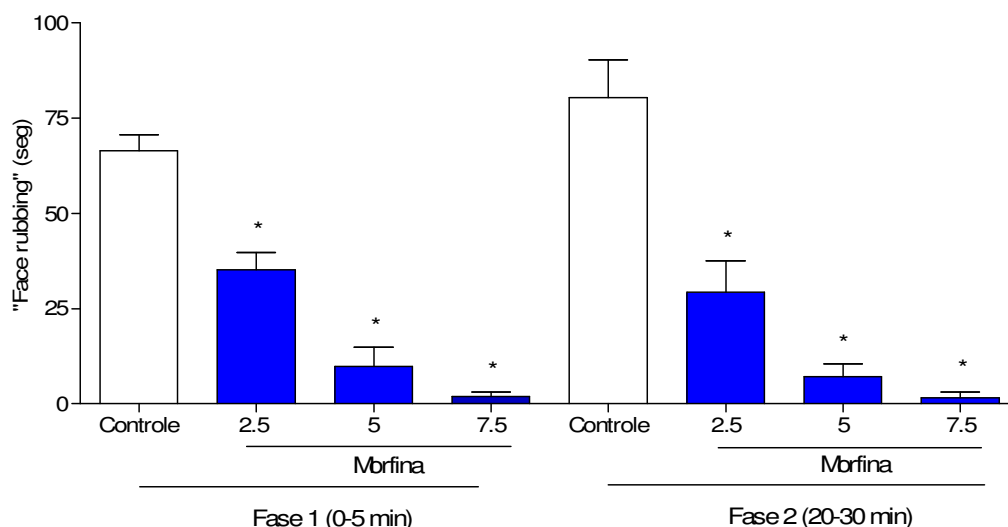


Figura 23. Avaliação da variação de doses de morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1ª fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2ª fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 30 minutos dos tratamentos com as doses de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/kg de morfina, via sub-cutânea. Um grupo controle (salina, s.c.) foi utilizado. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnet).

5.7. Efeito da β -amirina sobre a ingestão alimentar em animais submetidos ao teste de nocicepção induzida por formalina

O efeito do triterpeno β -amirina sobre a resposta alimentar não alterou a busca pelo alimento ($3,52 \pm 0,34$ mL de leite consumido), mesmo em animais submetidos à dor orofacial induzida por formalina ($p < 0,05$). O mesmo comportamento foi observado nos animais tratados com morfina ($4,37 \pm 0,42$ mL de leite consumido), quando comparados ao grupo controle normal, que não foi submetido à resposta álgica por formalina. O grupo controle formalina ($2,39 \pm 0,15$ mL de leite consumido) apresentou significativa resposta de rejeição ao alimento em relação ao grupo controle normal ($4,89 \pm 0,56$ mL de leite consumido). A associação de β -amirina + morfina ($4,42 \pm 0,50$ mL de leite consumido) não apresentou resposta cumulativa quando comparada com os grupos β -amirina e morfina, tratados separadamente (Figura 24).

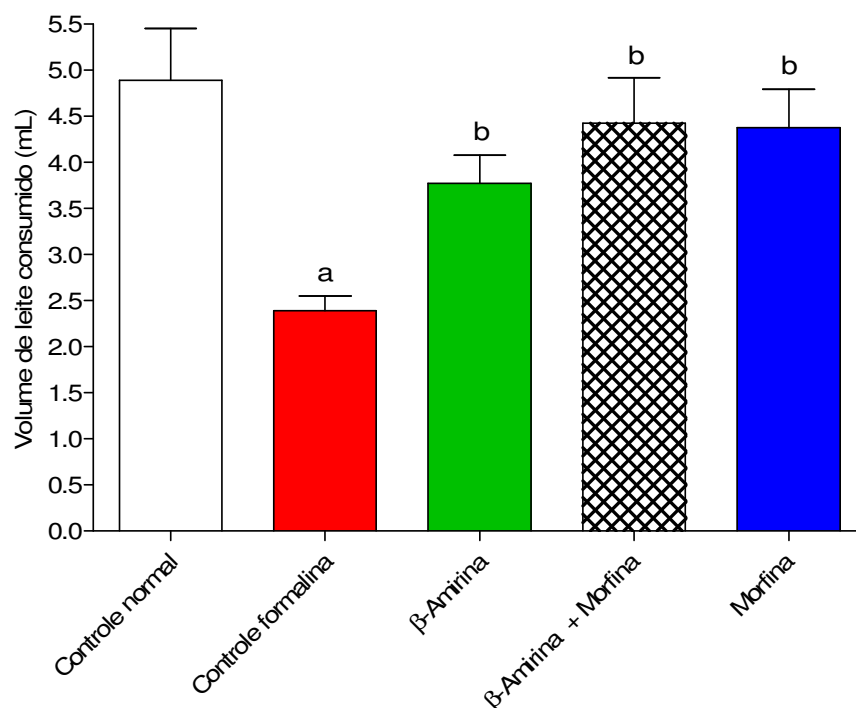


Figura 24. Média diária do consumo de alimento em camundongos tratados com β -amirina e submetidos à dor orofacial induzida por formalina, em um período de 5 dias. Os valores representam a média diária $\pm$ E.P.M. do consumo de bebida protéica, por um período de 5 dias de tratamento no modelo de dor orofacial induzida por formalina 0,05% (20 μ L/animal) na vibrissa direita dos camundongos. Os grupos testes foram: controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), controle formalina, β -amirina (30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). O grupo controle normal não foi submetido ao tratamento com formalina a fim de se observar o comportamento normal do animal frente ao alimento oferecido. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle normal; ^b $p < 0,05$ vs. Controle formalina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).

5.8. Avaliação do efeito da β -amirina no modelo de trânsito intestinal

O triterpeno β -amirina (30 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o trânsito intestinal ($43,45 \pm 0,28$ %) em relação ao grupo controle ($86,18 \pm 5,06$ %). Essa resposta apresentou similaridade ao controle morfina ($30,94 \pm 1,63$ %), conforme dados apresentados na tabela 18.

Na análise da participação de receptores opióides, observou-se que a co-administração do antagonista opióide naloxona foi capaz de reverter significativamente ($p < 0,05$) o efeito da β -amirina ($63,53 \pm 4,10$ %) (Tabela 18 e Figura 25).

Tabela 19. Efeito de β -amirina no trânsito intestinal, com carvão ativado, em camundongos: participação de receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	% Trânsito intestinal
Controle	-	$86,18 \pm 5,06$
β -Amirina	30,0	$43,45 \pm 0,28^a$
Morfina	5,0	$30,94 \pm 1,63^a$
Naloxona + β -Amirina	1,0 + 30,0	$55,24 \pm 2,00^b$
Naloxona + Morfina	1,0 + 5,0	$63,53 \pm 4,10^c$

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do percentual de trânsito intestinal, avaliado pela distância percorrida pelo carvão ativado / comprimento total do intestino delgado em camundongos submetidos ao tratamento com controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). A participação dos receptores opióides foi determinada com a administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -amirina; ^c $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por teste de múltipla comparação de Tukey).

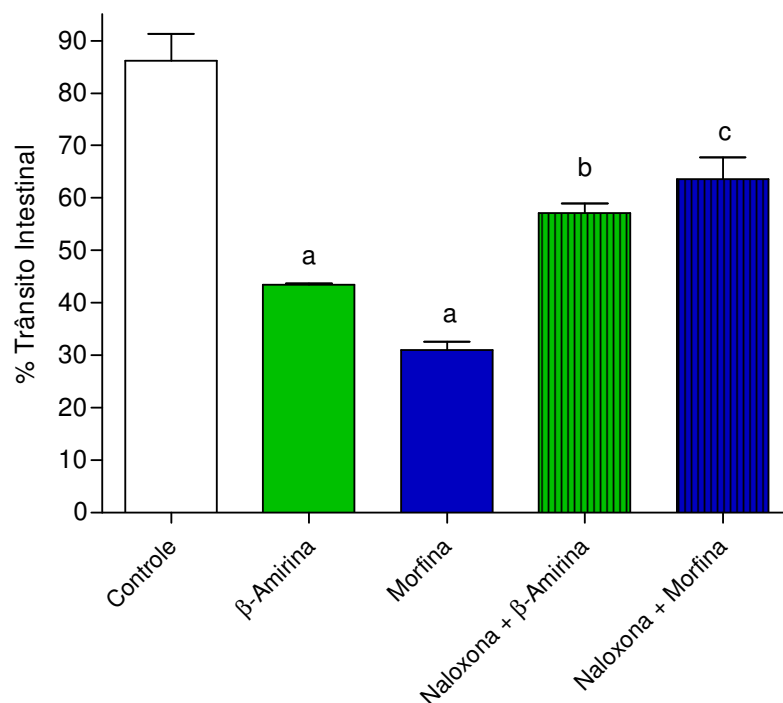


Figura 25. Efeito de β -amirina no trânsito intestinal, com carvão ativado, em camundongos: participação de receptores opióides. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do percentual de trânsito intestinal, avaliado pela distância percorrida pelo carvão ativado / comprimento total do intestino delgado em camundongos submetidos ao tratamento com controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). A participação dos receptores opióides foi determinada com a administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -amirina; ^c $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por teste de múltipla comparação de Tukey).

5.9. Efeito de β -amirina na atividade antinocéptica visceral: teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O triterpeno β -amirina, nas doses de 30 e 100 mg/kg, e o grupo morfina (5 mg/kg) apresentaram aumento significativo na proteção ao efeito do ácido acético no modelo de dor visceral ($13,00 \pm 0,91$; $8,83 \pm 1,72$ e $1,40 \pm 0,40$ contorções, respectivamente) em relação ao grupo controle ($40,60 \pm 3,51$ contorções) (Figura 26, os dados numéricos estão apresentados na Tabela 19, apêndice).

O pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg) reverteu significativamente ($p < 0,05$) o efeito antinociceptivo de β -amirina ($27,00 \pm 0,88$ contorções) e morfina ($30,29 \pm 3,04$ contorções), via receptores opióides. (Figura 27).

A participação de receptores TRPV1 foi observada pela reversão da resposta antinociceptiva de β -amirina ($31,43 \pm 3,74$ contorções) e morfina ($27,83 \pm 4,18$ contorções) quando estes grupos foram pré-tratados com vermelho de Rutênio (Figura 28).

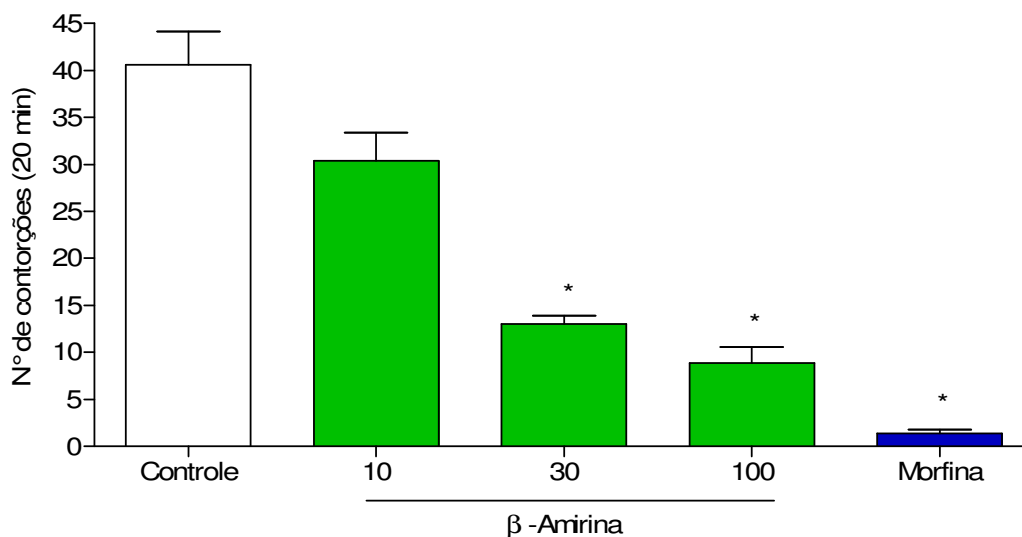


Figura 26. Efeito de β -amirina na dor visceral induzida por ácido acético. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do número de contorções, no período de 20 minutos, após a administração de ácido acético 0,6%. Os grupos testados foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -Amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). Foram utilizados 8 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnet).

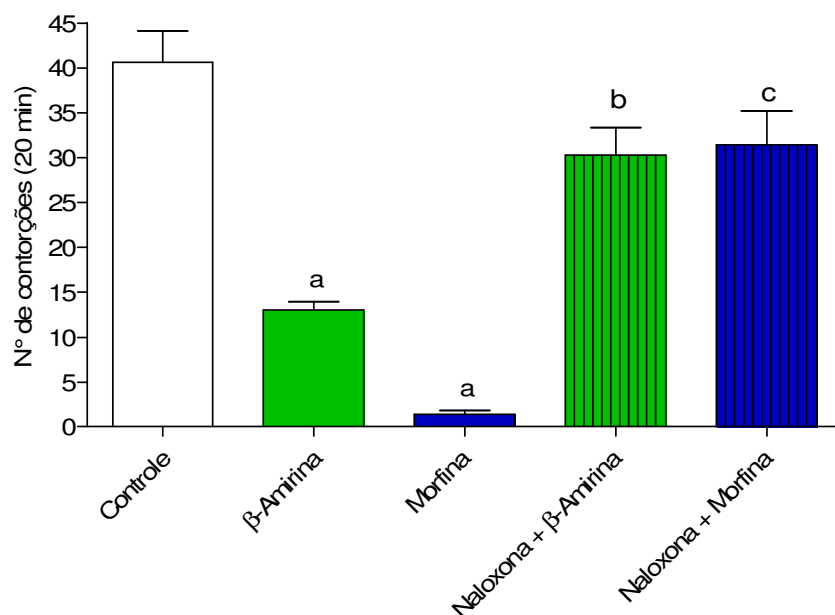


Figura 27. Efeito de β -amirina na dor visceral induzida por ácido acético: participação dos receptores opióides. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do número de contorções, no período de 20 minutos, após a administração de ácido acético 0,6%. Os grupos testados foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). Para observar a participação de receptores opióides administrou-se naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de β -Amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -Amirina e ^c $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).

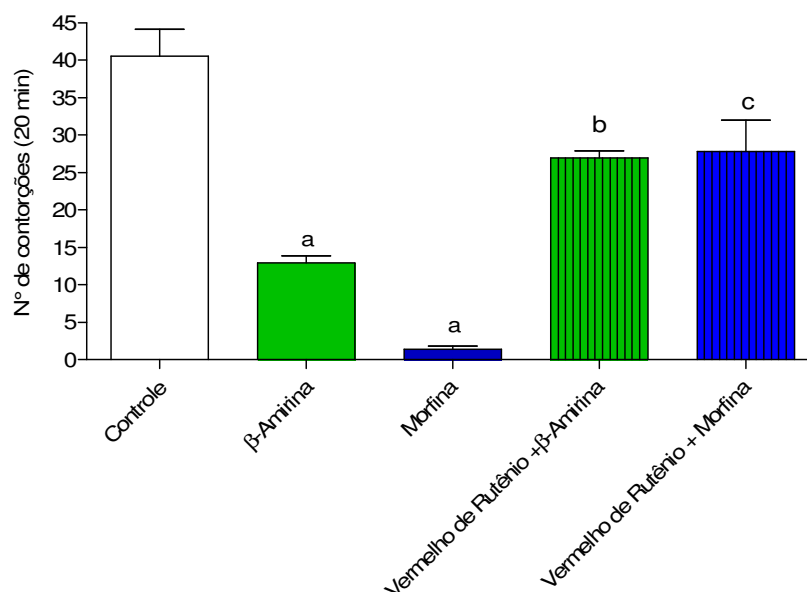


Figura 28. Efeito de β -amirina na dor visceral induzida por ácido acético: participação dos receptores TRPV1. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do número de contorções, no período de 20 minutos, após a administração de ácido acético 0,6%. Os grupos testados foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -Amirina (30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). Para observar a participação de receptores TRPV1 administrou-se vermelho de Rutênio (2 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle; ^b $p < 0,05$ vs. β -Amirina ^c $p < 0,05$ vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).

5.10. Avaliação do efeito da β -amirina no teste da placa quente

A tabela 20 apresenta o estudo do efeito do triterpeno β -Amirina, no modelo da placa quente. Os valores mostram o tempo em que o animal levou para responder ao estímulo térmico, 30 minutos antes do início dos tratamentos, no momento T 0 do tratamento, e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das drogas.

Neste modelo, β -Amirina nas doses de 3, 10 e 30 e mg/kg não apresentou resposta significativa ($p < 0,05$) nos tempos de latência estudados no modelo da placa quente quando comparado as respostas do grupo controle.

Tabela 21. Efeito de β -amirina no teste da placa quente em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de latência ao estímulo térmico (s)					
		T -30	T 0	T 30	T 60	T 90	T120
Controle	-	10,51 $\pm$ 1,43	9,85 $\pm$ 2,40	10,95 $\pm$ 2,09	7,78 $\pm$ 1,47	9,47 $\pm$ 1,33	8,46 $\pm$ 1,67
	3	14,16 $\pm$ 1,24	9,76 $\pm$ 2,21	12,16 $\pm$ 1,66	6,66 $\pm$ 1,03	8,71 $\pm$ 1,52	10,06 $\pm$ 2,78
β -Amirina	10	14,73 $\pm$ 2,06	14,14 $\pm$ 1,77	15,56 $\pm$ 1,58	12,09 $\pm$ 1,05	8,89 $\pm$ 1,51	10,15 $\pm$ 2,00
	30	15,85 $\pm$ 1,36	14,46 $\pm$ 1,48	9,49 $\pm$ 2,67	11,74 $\pm$ 1,58	15,94 $\pm$ 1,33	11,85 $\pm$ 0,77
Morfina	5	14,30 $\pm$ 1,75	13,48 $\pm$ 1,81	19,58 $\pm$ 1,97 ^a	27,18 $\pm$ 1,78 ^a	22,90 $\pm$ 2,93 ^a	17,21 $\pm$ 2,42 ^a
Naloxona + β -Amirina	1 + 30	13,44 $\pm$ 1,55	11,68 $\pm$ 0,66	11,00 $\pm$ 1,73	10,43 $\pm$ 0,77	10,44 $\pm$ 1,21	9,70 $\pm$ 1,32
Naloxona + Morfina	1 + 5	12,93 $\pm$ 1,69	12,46 $\pm$ 1,48	8,10 $\pm$ 1,19 ^b	10,58 $\pm$ 1,23 ^b	13,88 $\pm$ 1,99 ^b	12,56 $\pm$ 1,37

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de resposta a exposição de calor na placa quente, à 55 $\pm$ 0,5°C, representado pelo lambe a pata ou pular. A resposta foi observada 30 minutos antes, no momento, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias testadas. Os grupos testes foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). Para observar a participação de receptores opióides administrou-se naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 10 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle e ^b p<0,05 vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).

Discussão

6. DISCUSSÃO

Triterpenos pentacíclicos são metabólitos secundários de plantas, difundidos em cascas de frutas, folhas e casca do caule. Eles são considerados menos tóxicos e, farmacologicamente ativos, e, portanto, podem ser usados para o desenvolvimento de formulações fito farmacêuticas com a finalidade de evitar a dor. A análise fitoquímica da resina do *P. heptaphyllum* revelou a presença de α - e β -amirina, uma mistura de triterpenos pentacíclicos (SUSUNAGA *et al.* 2001; VIEIRAJUNIOR, 2005) pertencente ao grupo de ursano (α -amirina, 45-50%) e oleanano (β -amirina, 28-38%). Aos triterpenos são atribuídas diversas atividades farmacológicas, dentre estas podemos destacar: atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica (NIKIEMA *et al.*, 2001; ARRIETA *et al.*, 2003; SPESSOTO *et al.*, 2003, OLIVEIRA, 2004; OTUKI *et al.* 2005; LIMA-JÚNIOR, 2006; LIMA-JÚNIOR, 2007; HOLANDA PINTO, 2007; 2008). Estudos anteriores foram direcionados principalmente à atividade antinociceptiva da mistura de triterpenos alfa e beta-amirina, mas não à seus componentes individuais (OLIVEIRA *et al.*, 2005; OTUKI *et al.*, 2005).

Com base nas respostas apresentadas pela mistura de α -e β -amirina, nestes estudos anteriores, iniciou-se a pesquisa pela elucidação da resposta antinociceptiva dos triterpenos isolados, α -amirina e β -amirina, utilizando-se o modelo de dor orofacial induzida por capsaicina. Neste modelo, a β -amirina apresentou maior potencial de resposta antinociceptiva nas doses estudadas (30 e 100 mg / kg) em relação à α -amirina. Portanto, o presente estudo avaliou o potencial de ação antinociceptivo do triterpeno β -amirina em diversos modelos de dor aguda e os possíveis mecanismos envolvidos.

A dor orofacial apresenta uma elevada prevalência entre a população e está relacionada com aspectos emocionais e psicológicos (FEINMANN E NEWTON JOHN, 2004). A região orofacial é uma do local densamente innervada pelo nervo trigêmeo e o subnúcleos caudal do núcleo trigeminal, que são os principais meios para a transmissão de informações dor orofacial para outros núcleos do cérebro

(BEREITER *et al.*, 2000; VIGGIANO e col., 2005). Produtos químicos nocivos, como formalina e capsaicina injetados subcutaneamente na vibrissa (dor orofacial) ou a aplicação de substâncias pungentes, como a capsaicina, na conjutiva (“eye wiping test”) em espécies de roedores, são uns dos poucos testes comportamentais em estudos de dor no sistema trigêmeo (PELISSIER *et al.*, 2002; RABOISSON E DALLEL, 2004; FARAZIFARD *et al.*, 2005) na busca de novos compostos terapeuticamente úteis nas condições dolorosas orofaciais.

Nociceptores com projeções periféricas e centrais expressam temperatura potencial transitório de receptor sensível (canais TRP) de íons. O receptor transitório tipo potencial vanilóide 1 (TRPV1) é um ligante não-seletivos, canal de membrana catiônica fechado que está altamente expresso em neurônios aferentes primários nociceptivos, e seus terminais medeiam as respostas à estímulos de dor de indução, como a capsaicina (CATERINA *et al.*, 1997; SZALLAZI e BLUMBERG, 1999). Canais TRPV1 estão envolvidos tanto na termosensação quanto na nocicepção e sua ativação pode desencadear hiperalgesia primária ou secundária e alodinia (WILLIS, 1992). O papel do TRPV1 na dor inflamatória periférica e na sensibilização central durante a dor crônica tem sido bem documentado (MANDADI *et al.*, 2008). É uma molécula nociceptiva chave, localizada em neurônios primários aferentes nociceptivos no gânglio da raiz dorsal (DRG) para iniciar a inflamação neurogênica e a cascata de dor regulada (“upregulating”) pela proteína quinase C (PKC) (XU *et al.*, 2009), e desempenha um papel central em pacientes com hipersensibilidade retal e urgência fecal (CHAN *et al.*, 2003), síndrome da ardência bucal (YILMAZ *et al.*, 2007), síndrome do intestino irritável (AKBAR *et al.* 2008), e na manutenção e perpetuação dos sintomas em mulheres com dor pélvica crônica (POLI-NETO *et al.*, 2009). Nestas patologias, a dessensibilização induzida por agonista TRPV1 é uma das principais estratégias que oferecem uma maneira de aliviar a dor neuropática e nociceptiva (NOVAKOVA-TOUSOVA *et al.*, 2007).

A capsaicina, o princípio pungente encontrado na pimenta vermelha, quando aplicada topicamente ou injetada na pele humana ou em animais de experimentação, estimula receptores TRPV1 localizados nas fibras C sensoriais iniciando uma cascata de eventos incluindo excitação neuronal e liberação de mediadores, particularmente neuropeptídeos como a substância P (SP),

somatostatina, calcitonina e “gene-related peptide” (CGRP) (SZOLCSÁNYI *et al.*, 1998). A ativação destes neurônios sensoriais pela capsaicina produz dor em queimação, seguido por um estado refratário analgésico, quando de um subsequente estímulo nociceptivo (SZALLASI & BLUMBERG, 1999; SAADE *et al.*, 2002, XU *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no modelo de dor orofacial induzido por capsaicina, β -amirina nas doses de 30 e 100 mg / kg, apresentou diminuição significativa de intensidade de dor (80 a 90%) em resposta ao estímulo. Vários outros autores já demonstraram esse efeito antinoceptivo com uma mistura destes dois triterpenos em modelo de nocicepção visceral e plantar (OLIVEIRA, 2004; OTUKI *et al.*, 2005; LIMA-JUNIOR *et al.* e 2007) e orofacial (HOLANDA PINTO *et al.* 2007), mas este é o primeiro estudo que demonstra a eficácias relativa de α -amirina e β -amirina em um modelo experimental de dor orofacial.

Neuropeptídeos inflamatórios como SP e calcitonina “gene-related peptide” (CGRP) são sugeridos de participar da liberação de nociceptores aferentes primários que participam na inflamação após a aplicação subcutânea de capsaicina, resultando em dilatação (“flare”) neurogênica (SUMIKURA *et al.*, 2003; GEBER *et al.*, 2007) que foi detectado em nossos experimentos por termometria. Na inflamação, os níveis celulares de AMPc são elevadas, e o conseqüente aumento da atividade de AMPc-PKA dependente contribui para o desenvolvimento de hiperalgesia através da modulação do TRPV1 (MALMBERG *et al.*, 1997; HU *et al.*, 2002). Estudos anteriores mostraram que, a nível molecular, α , β -amirina inibem cAMP-PKA dependente (OTUKI *et al.*, 2005), e essa modulação por β -amirina poderia explicar a antinocicepção observada e a diminuição do “flare” neurogênica.

Termografia infravermelha e análise de imagens foram utilizadas para comparar o desenvolvimento da resposta neurogênica e a mudança térmica antes e após a injeção de capsaicina na vibrissa de camundongos. A hiperemia (representada pela diferença entre as temperaturas máxima e mínima, neste trabalho) reativa em camundongos antes da injeção de capsaicina foi, em média, de 2,34°C, e depois de capsaicina esta diferença triplicou. O pré-tratamento com β -

amirina, morfina ou L-NAME reduziu significativamente essa mudança térmica induzida por capsaicina para os níveis de controle visto antes capsaicina. No entanto, como esperado naloxona e capsazepina, os respectivos antagonistas dos receptores opióide e TRPV1 não conseguiram neutralizar os efeitos da redução de β -amirina e morfina na mudança térmica induzida por capsaicina.

Além disso, verificamos o potencial antinociceptivo de β -amirina em teste da formalina, empregado como um modelo de dor aguda e tônica, particularmente como um estímulo nociceptivo químico, é considerado como um dos mais válidos para o estudo da nocicepção. O teste permite avaliar a resposta do animal a uma hipernocicepção moderada e contínua causada pelo tecido lesado bem como o papel dos sistemas endógenos de regulação da dor (TJØLSEN, 1992).

A injeção de formalina na vibrissa produz uma resposta bifásica, a primeira fase da resposta ocorre devido à estimulação direta da formalina nas fibras C sensoriais, enquanto que a segunda fase deve-se ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória e a liberação de mediadores algésicos (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJØLSEN, 1992; LINO, 2008). Enquanto as drogas de ação central, como os analgésicos opióides, inibem as duas fases do teste, as drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios não-esteroidais e corticosteróides inibem somente a segunda fase da resposta. Os resultados do presente estudo confirmam a efetiva prevenção da morfina em ambas as fases do modelo. O triterpeno β -amirina também mostrou atividade antinociceptiva nas duas fases do teste da formalina, porém a resposta mais significativa foi observada na segunda fase deste modelo. Este resultado é discrepante a partir da observação feita com a mistura de triterpenos α , β -amirina, por Holanda Pinto *et al.* (2008), que foi eficaz apenas na segunda fase, mas não na primeira fase do comportamento nociceptivo. No nosso caso em que a antinocicepção em ambas as fases é sensível à naloxona, podemos inferir que, possivelmente, os opióides desempenhem um papel periférico.

Os efeitos algícos em todos os modelos acima referidos são devido à liberação de mediadores químicos que induzem a neuroinflamação. A atividade antinociceptiva de β -amirina pode estar relacionada com a redução na liberação desses mediadores ou por bloqueio direto dos receptores, resultando em

antinociceção periférica. Tradicionalmente, os opiáceos foram considerados o protótipo de ação central analgésicos. Na última década, uma substancial literatura surgiu demonstrando que os opióides podem produzir analgesia potente e clinicamente mensurável pela ativação de receptores opióides em terminais periféricos dos neurônios sensitivos primários (STEIN *et al.*, 2001). Analgesia opióide periférica é, sem dúvida, de relevância clínica, principalmente considerando que a terapia com opióides sistêmicos muitas vezes é prejudicada pelos efeitos colaterais centrais.

As evidências crescentes de inúmeros efeitos adversos dos opióides levaram à exploração de estratégias de tratamento não-opióides. Embora não forneça uma base molecular, este trabalho mostra a importância terapêutica dos tratamentos da combinação de morfina e β -amirina. Interessantemente, nos animais que receberam um tratamento combinado de β -amirina e morfina no nível da DE50 não demonstrou nenhuma potencialização significativa ou efeito antinociceptivo aditivo, mas ao baixar suas DE50 em 50% e 25%, os níveis de antinociceção apresentados foram semelhantes aos manifestados em seu equivalente no nível de DE50. Assim, este estudo aponta a possibilidade de uma redução da dose de morfina pela co-administração de β -amirina, com a finalidade de evitar a tolerância associada ao alto uso de morfina.

A dor neuropática diabética é geralmente considerada como uma das complicações mais problemáticas que afetam os pacientes diabéticos e a terapia utilizada atualmente proporciona um inadequado alívio desta dor. Uma complicação comum associada com diabetes é a neuropatia periférica diabética dolorosa ou indolor, que pode resultar na degeneração das fibras nervosas, tanto em animais diabéticos e quanto em pacientes desta patologia (SCHMIDT e PLURAD, 1986; PITTENGER *et al.*, 2004). O TRPV1 é um canal de cátion não seletivo e está amplamente distribuído nos terminais de fibras nervosas sensoriais, gânglio da raiz dorsal (DRG), medula espinhal, e muitas outras diferentes regiões do cérebro (SANCHEZ *et al.*, 2001). Ele pode levar à liberação de neurotransmissores como o

peptídeo calcitonina (CGRP) de terminações nervosas periféricas quando ativados pela capsaicina, prótons, calor nocivo, etc (CATERINA *et al.*, 2000).

Estudos anteriores descrevem duas fases distintas das mudanças de sensibilidade à dor térmica que ocorre em paralelo ao TRPV1 no diabetes experimental (PABBIDI *et al.*, 2008, 2009). Uma fase inicial hiperalgésica é seguida por uma segunda fase hipoalgésica acompanhada por um aumento ou diminuição da expressão de canais TRPV1. Quando analisamos a nocicepção induzida por capsaicina em camundongos diabéticos induzido por aloxano, observamos uma diminuição da resposta nociceptiva em animais diabéticos comparados com os não-diabéticos. Uma vez que o teste com capsaicina foi realizado com camundongos, quatro semanas após o diabetes estabelecido, presumimos que a nocicepção diminuída esteja paralelamente associada à expressão diminuída de receptores TRPV1, devendo ser um resultado da hiperglicemia prolongada. No entanto, β -amirina administrada por via oral (30 e 100 mg / kg) reduziu efetivamente a resposta nociceptiva evocada por administração de capsaicina no teste de dor orofacial. Similar à morfina, este efeito da β -amirina foi reversível ao pré-tratamento com naloxona.

A pesquisa do envolvimento de mudanças térmico no local de aplicação do agente algóstico é uma tentativa de encontrar novas alternativas para análise da resposta nociceptiva. Com o uso de câmera de captação infravermelho, a resposta antinoceptiva de β -Amirina (30 mg/kg), neste modelo, foi avaliada em relação a sua variação térmica no local, apresentando diminuição significativa da resposta térmica local, instantes após a aplicação de capsaicina e com retorno à sua temperatura basal após 10 minutos.

Segundo Szikskay *et al* (1982), baixas doses de capsaicina quando administradas intradermicamente aumentam a temperatura local nos primeiros minutos e esta retorna gradativamente até os valores iniciais. β -Amirina foi capaz de manter, maneira significativa, a temperatura basal dos animais normais submetidos

ao estímulo nociceptivo de capsaicina. Porém, o mesmo comportamento não foi confirmado em animais diabéticos.

O óxido nítrico (NO), um gás difusível, é produzido no sistema nervoso central, incluindo a medula espinhal e o núcleo trigeminal, as primeiras áreas centrais de processamento de informações nociceptivas da periferia. Estudos sugerem que o óxido nítrico produzido no núcleo trigeminal é pró-nociceptivo (JUNG *et al.*, 2009) e níveis de NO no sangue podem ter uma associação com dor orofacial crônica (COP). Níveis de NO na região orofacial de pacientes com COP é elevado. Um aumento regional nos níveis de NO provoca uma vasodilatação excessiva. Esta hiperperusão é manifestada por hipertermia da pele sobrejacente, enquanto que o NO aumenta a nocicepção, agravando a dor orofacial (GRATT e ANBAR, 2005). De acordo com estes estudos, em nossa pesquisa, os camundongos controle que receberam injeção subcutânea de capsaicina na vibrissa exibiram um aumento da resposta térmica associada com um aumento no “flare” neurogênico cutâneo (detectado por termometria), que diminuiu consideravelmente pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME, um inibidor da NOS, bem como pela β -amirina e morfina.

O estudo da dor trigeminal e os efeitos do uso de analgésicos nas dores agudas do trigêmio, como dor de cabeça, espasmos musculares, problemas dentários pós-cirúrgicos, tem sido um grande desafio (Sessle, 2007). Os modelos de dor intracutânea, como a dor tônica induzida por formalina na avaliação da eficácia analgésica especialmente na área de inervação do trigêmeo produzem dor severa para o animal e são limitados por considerações de ordem ética animal. Outros modelos como a ligadura do nervo infra-orbital representam uma maior simulação de dor crônica e neuropática. Finalmente, a falta de modelos de dor aguda como “tail flick” e testes de placa quente para o sistema trigêmeo é um fator limitante para esta pesquisa (FARAZIFARD *et al.*, 2005). A córnea é usada para estudos de nocicepção no sistema trigeminal, a córnea possui receptores nociceptivos com uma grande representação no gânglio trigeminal através do ramo oftálmico do nervo trigêmeo. As fibras amielínicas na córnea respondem a estímulos químicos, mecânicos e térmicos. Alguns pesquisadores têm utilizado o modelo de “eye wiping test” para investigar a pungência produtos químicos ou a presença da atividade de fibras C.

Farazifard *et al* (2005), sugeriram a possibilidade de introdução do “Eye-wiping test” como um modelo alternativo para avaliação de dor aguda em ratos. Estes pesquisadores compararam este modelo com o da Placa quente, usando doses variadas de Morfina como controle positivo (1, 2, 4, 6, 8 or 10 mg/kg) e, observaram que a morfina causava, de maneira dose-dependente, a diminuição da resposta do animal ao estímulo álgico nos dois modelos, concluindo que o modelo de “eye-wiping test” possa ser usado como método hábil no estudo da dor trigeminal, sendo sensível à substâncias opióides e antidepressivos tricíclicos.

Nossos resultados no modelo “eye-wiping test”, mostraram que o triterpeno β -Amirina diminuiu de maneira significativa a resposta ao estímulo álgico, em animais normais, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, sem apresentar dose-dependência, comportamento esse já apresentado nos modelos anteriores.

Clinicamente, a dor visceral é extremamente prevalente na população em geral, mas os seus mecanismos têm sido mal compreendidos quando comparados com a dor somática. Em condições inflamatórias, como colite e cistite, há desregulação do sistema opióide descendente que resulta da percepção de dor em excesso (ou seja, hiperalgesia visceral). Distúrbios intestinais funcionais e dor pélvica crônica representam uma sensação de dor inexplicável que não está associada a identificáveis doenças orgânicas. A sensibilização periférica ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, citocinas, etc), que ativam as fibras nervosas nociceptivas resultando em hiperalgesia primária (redução do limiar nociceptivo) e hipersensibilidade visceral (KOJIC *et al.*, 2007).

O teste de contorções por ácido acético é um modelo conveniente de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores, que determinam a nocicepção. Esse modelo é sensível à substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica dotadas dos mais variados mecanismos de ação (KOSTER *et al.*, 1959; LAPA e cols., 2008). Ribeiro *et al.*, (2000) mostram que as contorções abdominais induzidas por ácido acético são dependentes da presença de macrófagos peritoneais e conseqüente

libertação de IL-1 e TNF- α por essas células e que os mediadores envolvidos são múltiplos e incluem aminas simpatomiméticas e eicosanóides, que estimulam os neurônios nociceptivos. Apesar da inespecificidade do modelo de contorção por ácido acético, pois tanto analgésicos opióides, antidepressivos tricíclicos e drogas antiinflamatórias não-esteroidais inibem as contorções (FRANÇA et al., 2001; GONZALEZ et al., 2001; DAI et al., 2002; THOMAZZIA, 2010).

Neste modelo, o triterpeno β -Amirina, nas doses de 30 e 100 mg/kg e morfina (5 mg/kg) reduziu significativamente a nocicepção induzida pelo ácido acético, devido pelo sua ação anti-inflamatória (Ragasa et al., 2009; Vitor et al., 2009). A naloxona (1 mg/kg) reverteu o efeito antinociceptivo do β -Amirina e morfina.

O teste da placa quente, modelo validado por Eddy and Leimbach (1953), é comumente usado para pesquisa de drogas analgésicas narcóticas, drogas de ação central, incluindo sedativos e relaxantes musculares ou psicomiméticos, porém não é responsivo para AINEs e indometacina (THOMAZZIA, 2010; YASKSK & RUDY, 1977). No modelo de dor pela imersão da cauda, os animais tratados com β -Amirina nas doses de 10 e 30 mg/kg, apresentaram um significativo aumento no tempo de reação ao estímulo térmico.

β -amirina foi desprovida de ação analgésica quando avaliados sua atividade em modelo de nocicepção térmica no teste da placa quente, nas mesmas condições em que a morfina apresentou um efeito marcadamente analgésico. No entanto, β -amirina demonstrou uma antinocicepção sensível à naloxona no teste de imersão da cauda, sugerindo que neutraliza a nocicepção à nível espinhal, mas não supra-espinhal.

A pesquisa da ingestão alimentar em animais submetidos à dor orofacial induzida por formalina pretende demonstrar a eficácia da resposta de β -Amirina tanto na redução da resposta ao estímulo quanto ao retorno de atividade alimentar normal. O comportamento dos animais submetidos ao tratamento com o triterpeno não foi

alterado, permanecendo com os mesmos níveis significativos dos animais que não foram submetidos à dor. Este resultado revela o não comprometimento com a função alimentar, oferecendo uma melhoria na qualidade de vida aos portadores de dores crônicas, em especial do trigêmio, que têm sua capacidade alimentar diminuída pelo alto grau de sensação dolorosa a que está submetido, o que acarreta em perda de peso e má-nutrição, não pela falta de oferta de alimento, mais pela incapacidade de ingeri-lo.

O mecanismo pelo qual a β -amirina induz antinocicepção não ficou totalmente claro. Na maioria dos modelos testados (dor orofacial, “eye wiping test”, imersão da cauda, hiperalgesia visceral) de nocicepção empregados neste estudo, o seu efeito antinociceptivo foi significativamente diminuído em camundongos pré-tratados com o antagonista TRPV1, capsazepina (5 mg / kg, i.p.), e por um antagonista opióide não-seletivo, naloxona (1 mg / kg, i.p.), sugerindo uma possível participação de receptores TRPV1 e opióides em seu mecanismo. Os efeitos algícos nos modelos de teste são devido à liberação de mediadores como neuropeptídeos sensoriais que podem induzir a dor neuropática e/ou a cascata do ácido araquidônico que evocam dor inflamatória. Atividade antinociceptiva de β -amirina pode estar relacionada com a redução na liberação desses mediadores ou por bloqueio direto dos receptores, resultando em antinocicepção periférica. A analgesia opióide periférica é, sem dúvida, de relevância clínica, principalmente considerando que a terapia com opióides sistêmicos muitas vezes é prejudicada pelos efeitos colaterais centrais (OELTJENBRUNS E SCHAFER, 2005).

O papel dos receptores TRPV1 durante as condições inflamatórias tem sido bem esclarecido (CALIXTO et al., 2005). Estudos de Andrade *et al* (2008) mostraram que drogas agonistas TRPV1 causam uma consistente resposta nociceptiva quando injetadas na pata de camundongo, um efeito que parece ser mediado via ativação de receptor TRPV1 e dependente de fibras sensíveis à capsaicina, liberação de histamina e participação de taquininas via receptor NK-1. Neste sentido, estudo recente mostrou a diminuição da imunoreatividade de NK-1 nos animais tratados com α e β -amirina no modelo de nocicepção visceral induzida por ciclofosfamida (Lima-Junior et al., 2007) e antinocicepção reversível por capsazepina ainda em

outro modelo de nocicepção visceral induzida por óleo de mostarda (MAIA *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos nas pesquisas de Oliveira (2004), Lima-Junior (2007), Holanda Pinto (2008), usando a mistura de α e β -amirina, confirmam a possibilidade de atividade via sistema opióide. Esses autores realizam os testes de nocicepção via visceral e oral. A possibilidade da participação da via do Óxido Nítrico na nocicepção térmica pode ser sugerida na resposta pelo modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina, com a reversão significativa do efeito de β -amirina quando pré-tratada com L-NAME, um inibidor da síntese do óxido nítrico.

É pouco provável que a inibição da resposta nociceptiva por β -amirina observado neste trabalho pode ser atribuída ao comprometimento motor ou depressão do SNC. Os triterpenos que pertencem à série de oleanonos, como β -amirina, nas doses utilizadas neste estudo não causaram comprometimento motor ou sedação (OLIVEIRA *et al.*, 2005, MAIA *et al.*, 2006).

Em resumo, este estudo demonstra que o triterpeno β -amirina modula a dor neuropática e inflamatória em vários modelos experimentais de dor aguda induzida por produtos químicos (capsaicina, formalina e ácido acético) e estímulos térmicos (testes da placa quente e imersão de cauda). Esta observação é consistente com relatórios anteriores de nosso laboratório e também de outros estudos com triterpenóides. Interessantemente, este triterpenóide inibe a pungência associada com capsaicina, permite reduzir a dose de morfina de forma eficaz e, assim, diminuir seus possíveis efeitos adversos devido ao uso prolongado. Ele também demonstra que, diferentemente da morfina, não retarda o trânsito intestinal. Resultados também sugerem que a antinocicepção, pelo menos em parte, envolve a participação de receptores TRPV1 e receptores opióides periféricos, mais merece estudos adicionais mais detalhados sobre o seu mecanismo de ação e sua adequação para o desenvolvimento de um tipo farmacêutico de analgésico não-opióide.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, concluímos que:

✓ O triterpeno β -amirina apresentou efeito antinocetivo nos modelos de dor orofacial induzida por capsaicina e formalina, nociceção ocular induzida por capsaicina, nociceção térmica no modelo de imersão de cauda ($55 \pm 1^\circ \text{C}$), (mas não na placa quente) e nociceção visceral induzida por ácido acético.

✓ β -Amirina apresentou capacidade de suprimir a nociceção ocular causada pela capsaicina, evidenciada pelo “eye wiping test”.

✓ A antinociceção envolve a participação dos receptores TRPV1 e do sistema opióide endógeno, que pode ser revertida pelos respectivos antagonistas capsazepina e naloxona.

✓ O efeito da capsaicina no teste de nociceção orofacial é acompanhado por um aumento localizado de resposta térmica (mensurado por termometria), que foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento dos animais com β -Amirina ou L-NAME, um inibidor da NOS.

✓ A co-administração de β -amirina e morfina em suas respectivas DE_{50} não resulta em nenhum efeito aditivo ou potencialização do efeito antinocetivo no teste da formalina. No entanto, a combinação nas DE_{25} e $DE_{12,5}$, apresentou um efeito aditivo.

✓ Em comparação aos camundongos não-diabéticos, os animais diabéticos (4 semanas após a indução) manifestam nociceção diminuída (resposta de esfregar a face) no teste de capsaicina. Apesar de β -amirina mostrar eficácia neste modelo, a antinociceção é resistente a capsazepina (antagonista TRPV1), mas sensível ao antagonista opióide naloxona.

✓ Diferentemente da morfina, β -amirina não é eficaz contra a nocicepção térmica no teste da placa quente. No entanto, assim como a morfina, tem um efeito antinociceptivo no teste de imersão da cauda, que é sensível à naloxona, sugerindo um mecanismo opióide periférico.

✓ Em comparação com animais normais, os camundongos na nocicepção induzida por formalina tiveram uma menor ingestão de bebida protéica e nos animais pré-tratados com β -amirina ou morfina este efeito foi significativamente reduzido.

✓ β -amirina não apresentou significativo efeito pró-cinético ou sobre o trânsito intestinal enquanto que a morfina retarda o trânsito intestinal.

✓ Os dados obtidos sugerem que β -amirina tem uma promissora atividade analgésica em diferentes modelos de nocicepção química. Este terpenóide é livre de ação pungente, permitindo diminuir a dose efetiva de morfina e seus efeitos colaterais e, adicionalmente, apresenta propriedades antiinflamatórias. Com isso, pode ser usado como estratégia para o desenvolvimento farmacêutico de um analgésico não-opióide destinado à farmacoterapia de patologias dolorosas.

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHMAN, A., WANG, Y.X., CHANG, S.D., PANG, C.C. Mechanism of the vasodilator action of calcitonin gene-related peptide in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.** 106(1):45-8. 1992.
- AGREN, G., LUND, I., THIBLIN, I., LUNDEBERG, T. Tail skin temperatures reflect coping styles in rats. **Physiology & Behavior.** 96: 374-382. 2009.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. TAKIYA, C. M. ARRUDA, L. B. de. PASCARELLI, B. GOMES, R. N. FARIA NETO, H. C. C. LIMA, L. M. BARREIRO, E. J. LASSBio-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF- α and NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. **International Immunopharmacology.** 5: 485–494. 2005.
- AL-HARBI, M.M., QUESHI, S., RAZA, M., AHMED, M.M., AFZAL, M., SHAH, A.H. Gastric antiulcer and cytoprotective effect of Commiphora mol in rats. **J. Ethnopharmacol.** 55(2):141-50. 1997.
- AKBAR, A., YIANGOU, Y., FACER, P., WALTERS, J.R., ANAND, P., GHOSH, S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. **Gut.** 57(7):923-9. 2008.
- 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.
- ANAND, P., TERENCE, G., WARNER, G., KOPELMAN, P., WILLIAMS - CHESTNUT, R.E, SINICROPI, D.V. The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy. **Nat. Med.** 2:703-707. 2006.
- ANDRADE, A. C. **Dor: Diagnóstico e Tratamento.** São Paulo: Roca, 2001.
- ANDRADE, E.L., LUIZ, A.P., FERREIRA, J., CALIXTO, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPV1 receptor activation in mice. **Neuroscience.** 152: 511-520. 2008.
- ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAPEORGIOU, V.P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, 501-507, 2003.
- ANKIER, S.I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur. J. Pharmacol.** 27(1):1-4. 1974.
- ARAGÃO, G. F. **Atividade farmacológica da mistura isomérica de alfa e beta amirina extraído de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March.** 2004. 185 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ARAGÃO, G.F., CARNEIRO, L.M., JUNIOR, A.P., VIEIRA, L.C., BANDEIRA, P.N., LEMOS, T.L., VIANA, G.S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 85(4):827-34. 2006.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of *Amphipterygium adstringes*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905-909, 2003.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. São Paulo: A Edificação do Lar, 1969.

BALTINA, L.A., FLEKHTER, O.B., NIGMATULLINA, L.R., BOREKO, E.I., PAVLOVA, N.I., NIKOLAEVA, S.N., SAVINOVA, O.V., TOLSTIKOV, G.A. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 20;13(20):3549-52. 2003

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.

BARRETT, A. C.; SMITH, E. S.; PICKER, M. J. Capsaicin-induced hyperalgesia and muopioid-induced antihyperalgesia in male and female Fischer 344 rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 1, p. 237-245, 2003.

BASBAUM, A.E., JESSEL, T.M., The perception of pain. In: KADEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. **Principles Neural Science**. 4 ed. McGraw-Hill: New York, 472-791, 2000.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. A percepção da dor. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J.H.; Jessen, T, M. **Princípios da neurociência**. Barueri, SP: Manole, p.472-491, 2003.

BEAVAN, S., ANDERSSON, D. A. TRP channel antagonists for pain: opportunities beyond TRPV1. **Curr. Opin. Investig. Drugs**. Jul; 10(7):655-63. 2009.

BENOLIEL, R., EPSTEIN, J., ELIAV, E., JUREVIC, R., ELAD, S. Orofacial pain in cancer: part I--mechanisms. **J. Dent. Res.** 86(6):491-505. 2007.

BEREITER, D.A., HIRATA, H., HU, J.W. Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. **Pain**. 1;88(3):221-4. 2000.

BOYAKA, P.N., MCGHEE, J.R. Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 23;51(1-3):71-9. 2001.

BRIOSCHI, M.L., MACEDO, J.F., MACEDO, R.A.C. Termometria cutânea: novos conceitos. **J. Vasc. Br.** 2(2):151-60. 2003.

BRIOSCHI, M.L., CIMBALISTA, M. Jr., NAKAGAWA, C.R. Avaliação intraoperatória da revascularização cardíaca por angiografia térmica coronária: estudo experimental preliminar. **Arq. Med.** Curitiba. 1(2):95-98. 2000.

BROMM, B. & LORENZ, J. Neurophysiological evaluation of pain. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.** 107: 227-253, 1998.

BRUSSEE, V., CUNNINGHAM, F.A., ZOCHODNE, D.W. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. **Diabetes.** 53:1824-1830. 2004.

BÜCHELE, B; ZUGMAIER, W; SIMMET, T. Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. **Journal of Chromatography B**, v. 791, p. 21-30, 2003.

CAILLIET, R. **Dor: Mecanismos e tratamentos.** Porto Alegre: Editora Artes. Médicas Sul LTDA. p. 274-284. 1993.

CALIXTO, J. B. SCHEIDT, C. OTUKI, M. SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. [Expert. Opin. Emerg. Drugs.](#) Oct: 6 (2): 61-79. 2001.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.** 55(3):37-39. 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology.** 100: 131–134. 2005.

CAPASSO, R. IZZO, A. A. PINTO, L. BIFULCO, T. VITOBELLO, C. MASCOLO, N. **Phytatherapy and quality of herbal medicines.** *Fitoterapia.* v: 71; p: 58-65, 2000.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience;** v. 24, p. 487-517, 2001.

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.** 23:389(6653):816-24. 1997.

CHAN, S.A., CHEN, M.J., LIU, T.Y., FUH, M.R., DENG, J.F., WU, M.L., HSIEH, S.J. Determination of aristolochic acids in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-ion trap mass spectrometry. **Talanta.** 4;60(4):679-85. 2003.

CHARKOUDIAN, N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: How it works, when it does not, and why. [Mayo Clin. Proc.](#) 78(5):603-12. 2003

CHOWDHURY, M.M., BOARD, R. Morphine-induced hallucinations – resolution with switching to oxycodone: a case report and review of the literature. **Cases Journal**. 2:9391. 2009.

COLLIER, H. O. J. DINNEEN, L.C. JOHNSON, C. A. SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its Suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmac. Chemother.** 32: 295-310. 1968.

COLOMBINI, N. E. P., Cirurgia do terço inferior da face. **Cirurgia maxilofacial**. 561-571, 1991.

CORTRIGHT, D. N., SZALLASI, A. TRP channels and pain. **Curr. Parm. Des.** 5(15):1736-49. 2009.

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.

COSTA, V. B.; COUBE, C. S.; MARINHO, B. G.; MATHEUS, M. E.; LEITAO, S. G.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 364-371, 2003.

COSTIGAN, M., SCHOLZ, J., WOOLF, C. Neuropathic pain: a maladaptive response oh the nervous system to damage. **Annu. Rev. Neurosci.** 32: 1-32. 2009.

COUTAX, A., ADAN, F., WILLER, J.C., LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Join Bone Spine**, 2005 [in press].

COWAN, D.T., ALLAN, L.G., LIBRETO, S.E., GRIFFITHS, P. Opioid drugs: a comparative survey of therapeutic and “street” use. **Pain Med.** 2: 193-203, 2001.

DECOSTERD, I., ALLCHORNET, A., WOOLF, C.J. Differential analgesic of two distinct neuropathic pain models. **Anesth. Analg.** 99: 457-63. 2004.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.

DJOUHRI, L., BLEAZARD, L., LAWSON, S.N. Association of somatic action potencial shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurons. **J. Physiol.**, 513:857-872, 1998.

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.

DRAY, A., & PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin System**. Academic Press: London, 157-172, 1997.

DOUBELL, T. P.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Churchill Livingstone. *Textbook of pain*. London: P.D. Wall; R. Melzack, p. 165-81, 1999.

DWORKIN, R. H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; ALLEN, R. R.; ARGOFF, C. R.; BENNETT, G. J.; BUSHNELL, M. C.; FARRAR, J. T.; GALER, B. S.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; HEWITT, D. J.; LOESER, J. D.; MAX, M. B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K. E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; WATKINS, L. R.; WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*, v. 60, n° 11, p.1524-34, 2003.

[EDDY, N.B.](#), [LEIMBACH, D.](#) Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. [J. Pharmacol. Exp. Ther.](#) 107(3):385-93. 1953.

EPSTEIN, J.B. Oral malignancies associated with HIV. **J. Can. Dent. Assoc.** 73(10):953-6. 2007.

ESTRADA, A.; KATSELIS, G. S.; LAARVELD, B.; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 27-43. 2000.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**. 109(1):69-74. 2001.

FARAZIFARD, R.; SAFARPOUR, F.; SHEIBANI, V.; JAVAN, M. Eye-wiping test: a sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. [Brain Res Brain Res Protoc](#). 16(1-3):44-9. 2005.

FEINMANN, C.; NEWTON-JOHN, T. Psychiatric and psychological management considerations associated with nerve damage and neuropathic trigeminal pain. **J. Orofac. Pain**. 18(4):360-5. 2004.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. S. Constituents of the Argentina medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. 89: 73-80. 2003.

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.* 141:787-794. 2004.

FISHER, J. T. the TRPV1 ion channel: Implications for respiratory sensation and dyspnea. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** 167:45-52. 2009.

FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** 66: 375-400, 1925.

FRANCO, L.J., MILECH, A., BRAGA, C.D.C., MALERBI, D., CAMPOS, G.P., ALMEIDA, L., SCHMIDT, M.I., ALBUQUERQUE, R.H. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil. Ministério da Saúde. **Censo de Diabetes.** 1-32. 1998.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** 48:129-141, 1999.

GABRA, B.H., BERTHIAUME, N., SIROIS, P., NANTEL, F., BATTISTINI, B. The kinin system mediates hyperalgesia through the inducible bradykinin B1 receptor subtype: evidence in various experimental animal models of type 1 and type 2 diabetic neuropathy. **Biol. Chem.** 387:127-143. 2006.

GALVÃO, A.C.R. **Dor neuropática: tratamento com anticonvulsivantes.** S. Paulo. 2005. 40p.

GILL, S.J.; OAKLANDER, A.L. **The Neurologist.** 7: 263-269. 2001

GNANAPRAGASAM, A.; EBENEZAR, K. K.; SATHISH, V.; GOVINDARAJU, P.; DEVAKI, T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. **Life Science.** 76(5):585-597. 2004.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** 81(1):8-11. 1998.

GUPTA, M. & BRANS, Y. W. Gastric retention in neonates. **Pediatrics.** 62(1): 26-29, 1978.

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

[HARVEY, V.L.](#), [Dickenson, A.H.](#) Mechanisms of pain in nonmalignant disease. [Curr. Opin. Support. Palliat. Care.](#) 2(2):133-9. 2008.

HAYES, T.A. The pharmaceutical industry--to whom is it accountable? **N. Engl. J. Med.** 9;343(19):1416. 2000.

HEIKKILA, R.E., WINSTON, B., COHEN, G. Alloxan-induced diabetes-evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. **Biochem. Pharmacol.** 1;25(9):1085-92. 1976.

HENRY, J.L., YASHPAL, K., PITCHER, G.M., CHABOT, J.G., CODERRE, T.J. An evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the rat. **J. Neurosci.** 19:6588-98. 1999.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C.C.; MONTALBETTIMORENO, Y.; RABANAL, R.M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. **J. Ethnopharmacol.** (93):279-84. 2004.

HOLANDA PINTO, S. A., PINTO, L. M. S., GUEDES, M. A., CUNHA, G. M. A., CHAVES, M. H., SANTOS, F. A., RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid α , β -Amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phymed.** 2007.

HOLANDA PINTO, S. A., PINTO, L. M. S., CUNHA, G. M. A., CHAVES, M. H., SANTOS, F. A., RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammapharmacology.** 6: 48-52. 2008.

HUANG, M. T.; BADMAEV, V.; DING, Y.; LIU, Y.; XIE, J. G.; HO, C. T. Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. **Biofactors.** 13:(1-4):225-230. 2000.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30(1):103-14. 1987.

JULIUS, D. & BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210, 2001.

JUNG, H. J.; NAM, J. H.; CHOI, J.; LEE, K. T.; PARK, H. J. 19 α -hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive, anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. **Biological Pharmaceutical Bulletin.** 28(1):101-104. 2005.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.** 87(1):3-11. 2001.

KIELA, P. R.; MIDURA, A. J.; KUSCUOGLU, N.; JOLAD, S. D.; SOLYOM, A. M.; BESSELSSEN, D. G.; TIMMERMANN, B. N.; GHISHAN, F. K. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology.** 288(4):798-808. 2005.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacologica Sinica.** 24(1):7-21. 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*, 18:412-417.1959.

KRAUSE, J. E., CHENARD, B. L., CORTRIGHT, D. N. Transient receptor potential ion channel as targets for the discovery of pain therapeutics. **Curr. Opin. Investing Drugs**. 6(1):48-57. 2005.

KRÓLEWSKI AS, WARRAM JH, RAND LI, KANN CR. Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. **N. Engl. J. Med.** 317:1390-8.1987.

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

KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A. Antilipoxygenase activity of amyrin triterpenes. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** 78:367-72.1992.

LAMA, E.A..L., MELO, F.M.L. **Abordagem da Fisioterapia no Tratamento da Neuralgia do Trigêmeo**. Lato & Sensu, Belém. 4(1):3-5. 2003.

LAPA, A. J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M. T. R., CASTRO, M.S. de A., LIMA, T. C. M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. São Paulo: UNIFESP/EPM. 5ª Ed. 2007. 144p.

La PORTE, R.E. Cruickshanks: incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes. In: Harris, M.I., Hamman, R.F. Diabetes in America. Washington: **National Diabetes Data Group**, Niaddk/US Dept. Health and Human Services. 1-12.1985.

LEACH, M. J. The clinical feasibility of natural medicine, venotonic therapy and horsechestnut seed extract in the treatment of venous leg ulceration: a descriptive survey. **Complementary Therapies in Nursing and Midwifery**. 10(2):97-109. 2004.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**. 20(3):315-24. 2005.

LERCO, M.M., SADELLA, C.T., MACHADO, J.L.M., SCHELLINI, S. A., PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 18:2. 2003.

[Le RESCHE, L.](#), [BURGESS, J.](#), [DWORKIN, S.F.](#) Reliability of visual analog and verbal descriptor scales for "objective" measurement of temporomandibular disorder pain. [J. Dent. Res.](#) 67(1):33-6. 2001

LEVINE, J. D., ALESSANDI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1772: 989-1003. 2007.

LIMA-JÚNIOR, R.C., SOUSA, D.I., BRITO, G.A., CUNHA, G.M., CHAVES, M.H., RAO, V.S., SANTOS, F.A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflamm. Res.** 56(12):487-94. 2007.

LIMA-JÚNIOR, R.C., OLIVEIRA, F.A., GURGEL, L.A., CAVALCANTE, I.J., SANTOS, K.A., CAMPOS, D.A., VALE, C.A., SILVA, R.M., CHAVES, M.H., RAO, V.S., SANTOS, F.A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.** 72(1):34-9. 2006.

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

LUCCARINI, P., HENRY, M., ALVAREZ, GAYDIER, A.M., DALLEL, R. Contribution of neurokinin 1 receptors in the cutaneous orofacial pain. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv. Pharmacol.** 368: 320-23. 2003.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**. 37(6), 1517-1575. 1994.

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**. 23:623-625. 2000.

MALAIRAJAN, P., GOPALAKRISHNAN, G., NARASIMHAN, S., VENI, K.J.K.. Analgesic activity of some Indian medicinal plants. **J. Ethnopharmacology**. 106: 425-28. 2006.

MALBERG, J.E., SEIDEN, L.S. Administration of fenfluramine at different ambient temperatures produces different core temperature and 5-HT neurotoxicity profiles. **Brain. Res.** 8;765(1):101-7. 1997.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol. Sci.**, 17(12): 457-462. 1996.

MANDADI, S., ROUFOGALIS, B.D. ThermoTRP Channels in Nociceptors: Taking a Lead from Capsaicin Receptor TRPV1. **Curr. Neuropharmacol.** 6(1):21-38. 2008.

MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, 334:103-105. 1997.

MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P. Dammarane triterpenos of *Commiphora confusa* resin. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 51(5): 483-486. 2003.

MANGURO, L. O. A.; UGI, I.; LEMMEN, P. Further bisabolenes and dammarane triterpenes of *Commiphora kua* resin. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. 51(5):479-482. 2003.

MATOS, F. J. A. **O Formulário Fitoterápico do Professor Dias Rocha**. 2^a ed. Fortaleza: EUFC. 1997. 260p.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da Dor. IN: MENEZES, R. A. (org.). **Síndromes Dolorosas – Diagnóstico-Terapêutico – Saúde Física e Mental**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 9-19, 1999.

McCURDY, C.R., SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**. 78:476 – 484. 2005.

MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**. 6:249-252, 1979.

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

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol**. 57: 1-164. 1999.

MIÑO, J., ACEVEDO, C., MOSCATLLI, V., FERRARO, G., NATYSZYN, O. Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. **J. Ethnopharmacology**. 79: 179-182. 2002.

NAGY, I.; SANTHA, P.; JANCOS, G.; URBAN, L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. **European Journal of Pharmacology**. 500(1-3):351-369. 2004.

NAH, J. J.; HAHN, J. H.; CHUNG, S.; CHOI, S.; KIM, Y. I.; NAH, S. Y. Effect of ginsenosides, active components of ginseng, on capsaicin-induced pain-related behavior. **Neuropharmacology**. 39(11):2180-2184. 2000.

NAVEBI, A.M., REZAZADEH, H., PARSA, Y. Effect of fluoxetine on tolerance to the analgesic effect of morphine in mice with skin cancer. [Pharmacol Rep](#). 61(3):453-8. 2009.

NIKIEMA, J. B., VANHAELEN-FASTRE, R., VANHAELEN, M., FONTAINE, J., DE GRAEF, C., HEENEN, M. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. **Phytotherapy Research**, v. 15, n.2, p. 131-134, 2001.

[NOVAKOVA-TOUSOVA, K.](#), [VYKLYCKY, L.](#), [SUSANKOVA, K.](#), [BENEDIKT, J.](#), [SAMAD, A.](#), [TEISINGER, J.](#), [VLACHOVA, V.](#) Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. [Neuroscience](#). 12;149(1):144-54. 2007.

OELTJENBRUNS, J., SCHÄFER, M. Peripheral opioid analgesia: clinical applications. **Curr. Pain. Headache Rep.** 9(1):36-44. 2005.

OLIVEIRA, F.A. ; LIMA JÚNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.DA ; SANTOS, F.A. ; RAO V.S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**. Itália, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v.70, nº 8, p. 780-782, 2004b.

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.

OTSUKA, K., OKADA, S., HASSAN, M., TOGAWA, T. Imaging of skin thermal properties with estimation of ambient radiation temperature. **IEEE Engineering in Medicine and Biology**. Downloaded on February 8. 2009.

OTUKI, M. F. ; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Science**, v. 69, n. 19, p. 2225-2236, 2001a.

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.

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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005.

OTUKI, M. F. ; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alphaamyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p.253-259, 2005b

PABBIDI, R.M., YU, S.Q., PENG, S., KHardORI, R., PAUZA, M.E., PREMKUMAR, L.S. **Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain Sensitivity. *Molecular Pain*. 4:9. 2008.**

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

PELISSIER, T., PAJOT, J., DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects os different capsaicin concentrations and morphine. ***Pain***. 96: 81-87. 2002.

[PERNET, R.](#) **Review of Hernandiaceae. *Planta Med*. 20(4):314-9. 1971.**

PESKAR, B. M.; RESPONDEK, M.; MULLER, K. M.; PESKAR, B. A. A role for nitric oxide in capsaicin-induced gastroprotection. ***European Journal of Pharmacology***, v. 198, n. 1, p. 113-114, 1991.

PETERSON, L.J., ELLIS, E., TUCKER, M.R., HUPP, J.R. ***Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea***. 619-631, 1993.

PIERSON, C.R., ZHANG, W., MURAKAWA, Y., SIMA, A.A.F. Insulin deficiency rather than hyperglycemia accounts for impaired neurotrophic responses and nerve fiber regeneration in type 1 diabetic neuropathy. ***J. Neuropathol. Exp. Neurol.*** 62:260-271. 2003.

PIMENTA, C. A. de M., MOTA, D. D. C. de F., CRUZ, D. A. L. M. da. ***Dor e cuidados paliativos: Enfermagem, Medicina e Psicologia***. Ed. Manole. 498 p. 2006.

PINTO, A. C. SILVA, D. H. S. BOLZANI, V.S. LOPES, N. P. EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. ***Química nova***. V: 25, p: 45-61, 2002.

PIPELEERS, D. & M. VAN de WINKEL. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 83: 5267-71. 1986.

PITTENGER, G.L., RAY, M., BURCUS, N.I., McNULTY, P., BASTA, B., VINIK, A.I. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. ***Diabetes Care***. 27(8):1974-9. 2004.

POLI-NETO, O.B., FILHO, A.A., ROSA e SILVA, J.C., BARBOSA, H. de F., CANDIDO dos REIS, F.J., NOGUEIRA, A.A. Increased capsaicin receptor TRPV1 in the peritoneum of women with chronic pelvic pain. ***Clin. J. Pain***. 25(3):218-22. 2009.

PORRECA, F., OSSIPOV, M.H., GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. ***Trends Neurosci***. 25: 319-324, 2002.

QUEIROZ, E. F. FARO, R. R. de A. MELO, C. A. A biodiversidade brasileira como fonte de novas drogas: passado, presente e futuro. ***Revista de Fitoterapia***. 9: (S1). 2009.

RAJA, S.N., MEYER, R.A., RINGKAMP, M., CAMPBELL, J.N. In **Textbook of Pain**. (Eds Wall, P. D., Melzack, R.), Churchill Livingstone, Ediburgh, 11-57, 1999.

RAMABADRAN, K., BANSINATH, M., TURNDORF, H., PUIG, M.M. Tail immersion test for the evaluation of a nociceptive reaction in mice. Methodological considerations. **J. Pharmacol. Methods**. 21(1):21-31. 1989.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Pharmacology**. Elsevier. 6th Edition, 2007.

RAO, V. S., SANTOS, F. A., SOBREIRA, T.T., SOUZA, M.F., MELO, C.L., SILVEIRA, E.R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viciosa*. **Planta Med.**, 63(2): 146-149, 1997.

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.

RO, J.Y., LEE, J-S., ZHANG, Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hiperalgesia. **Pain**. 144: 270-277. 2009.

ROBERT, A., NÉZAMIS, J.E., LANCASTER, C., HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, 77:433-443, 1979.

RODRIGUES, D. A. Atividade gastroprotetora e antioxidante de extratos e constituintes químicos de *Byrsonima sericea* dc. e *Plectranthus grandis* cramer (willenssem). Tese. 2008. 146 f.

RUSSO, C.M. & BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** 49: 123-133, 1998.

SAADE, N. E; MASSAAD, C. A; OCHOA-CHAAR, C. I.; JABBUR, S. J.; SAFIEHGARABEDIAN, B.; ATWEH, S. F. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by subplantar injection of capsaicin in rats. **Journal of Physiology**, v. 545, n. 1, p. 241-253, 2002.

SAFAYHI, H.; SAILER, E- R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Review. **Planta Medica**, 63, p. 487-493, 1997.

SAKATA, R. K., ISSY, A. M. **Fármacos para o tratamento da dor**. Ed. Manole. 2008. 325p.

SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuroscience Letters**. 235: 73-76. 1997.

SBED-Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2009. Disponível em: <http://www.dor.org.br/impactosdor.asp>>. Acesso em: 13 de julho 2009.

SCHAIBLE, H.G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**. 36(1):8, 10-2, 14-6. 2007.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A., et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, 57 (Supl 1) S3–S9, 2008.

SCHMIDT, R.E., PLURAD, S.B. Ultrastructural and biochemical characterization of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 45(5):525-44. 1986.

SCHULTZ, D.J.; OLSEN, C.; COBBS, G.A.; STOLOWICH, N.J. AND PARROTT, M.M. Bioactivity of Anacardic Acid against Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) Larvae. **J. Agric. Food Chem.**, 54, p. 7522-7529, 2006.

SEDLAK, J. & LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, 25: 192-205, 1988.

SENAY, S. E. & LEVINE, R.J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcer in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 124:1221-1223, 1967.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol.** 71: 117-36. 2005.

SESSLE, B.J. Glia: non-neural players in orofacial pain. **J. Orofac. Pain.** 21(3):169-70. 2007.

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.

SIMA, A.A.F. Diabetes underlies common neurological disorders. **Ann. Neurol.** 56:459-461. 2004.

SHIN, K. M.; KIM, R. K.; AZEFACK, T. L.; DAVID, L.; LUC, S. B.; CHOUDHARY, M. I.; PARK, H. J.; CHOI, J. W.; LEE, K. T. In vitro anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7cells. **Planta Medica**, v. 70, n. 9, p. 803-807, 2004.

SMITH, A.G., RAMACHANDRAN, P., TRIPP, S., SINGLETON, Z.R. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. **Neurology**. 57:1701-1704. 2001.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 606-609, 2003.

STASI, L.C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002.

STICKNEY, J.C. & NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 101: 582, 1959.

SUGIMOTO, K., MURAKAWA, Y., SIMA, A. A. Diabetic neuropathy a continuing enigma. **Diabetes/Metabolism Res. Rev.** 16:408-433. 2000.

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

SZALLASI, A., BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience** 30 (2): 515-520.1989.

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

SZIKSZAY, M.; OBAL, F. J. R.; OBAL, F. Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 320(2):97-100. 1982.

SZOLCSANYI, J; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **The Journal of Physiology**. 95(1-6):181-188. 2001.

TAKAGI, K., OKABE, S., SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Jpn. J. Pharmacol.**, 19b: 418. 1970.

TALHOUK, R. S. KARAM, C. FOSTOK, S. EI- JOUNI, W. BARBOUR, E. K. Anti-Inflammatory Bioactivities in Plant Extracts. **J. Med. Food**. 10 (1): 1–10. 2007.

The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** 329:977-986. 1993.

THOMAZZIA, S.M., SILVA, C.B., SILVEIRA, D.C.R., VASCONCELLOS, CL.C., LIRA, A.F., CAMBUÍB, E.V.F., ESTEVAMB, C.S., ANTONIOLLIC, S.M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**. 127: 451–456. 2010.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51:5-17. 1992.

TREDE, R D.; MEYER, R A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Prog Neurobiol**. 38A:397- 421.1992.

TSUJI, F., MURAI, M., OKI, K., SEKI, I., UEDA, K., INOUE, H., NAGELKERKEN, L., SASANO, M., AONO, H. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists as

candidates for anti-inflammatory and immunomodulatory agents. **European Journal of pharmacology**. Article in press. 2009.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**. 9(10):450-458. 2004.

URBAN, M.O., & GEBHART, G.F. Central mechanisms in pain. **Med. Clin. North Am.** 83: 585-596, 1999.

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

VIGGIANO, A., MONDA, M., VIGGIANO, A., VIGGIANO, D., VIGGIANO, E., CHIEFARI, M., AURILIO, C., De LUCA, B. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. **Brain Res.** 19;1050(1-2):72-8. 2005.

VILLASEÑOR, 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. **Journal of Ethnopharmacology**. 92(1):53-56. 2004.

VISSCHER, F. E., SEAY, P. H., TAZELAAR, A. P. JR., VEDKAMP, W., VANDER BROOK, M. J. Pharmacology of Pamine Bromide. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 110: 188-204. 1954.

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.** 28:183-187. 2005.

VINIK, A.I., PARK, T.S., STANSBERRY, K.B. Diabetic neuropathies. **Diabetologia**. 43:957-973. 2000.

VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; MOSUGU, O.; CHINDO, B. A.; NGAZAL, I. E.; SALAWU, A. O.; KWANASHIE, H. O.; GAMANIEL, K. S. Antinociceptive profile of the methanolic extract of *Neorautanenia mitis* root in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 92(2/3): 317-24. 2004.

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.** 19:75-7. 2005.

WHITE, F., WILSON, N. Opiate-induced hypernociception and chemokine receptors. **Neuropharmacology**. 58: 35-37. 2010.

YAKSH, T.L., RUDY, T.A. A dose ratio comparison of the interaction between morphine and cyclazocine with naloxone in rhesus monkeys on the shock titration task. **Eur. J. Pharmacol.** 15;46(2):83-92. 1977.

YUNES, R. A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**. 24 (1): 147-152. 2001.

ZANOELLO, A.M., MELAZZO-MAZZANTI, C., KERPEL-GINDRI, J., FILAPPI, A., PRESTES, D., CECIM, M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes Mellitus induzido por aloxona em ratos. **Acta Farm. Bonaerense**. 21(1): 31-36. 2002.

ZHANG, Z., JIANG, J., YU, P., ZENG, X., LARRICK, J.W., WANG, Y. Hypoglycemic and beta cell protective effects of andrographolide analogue for diabetes treatment. **Journal of Translational Medicine**. 7:62. 2009.

ZOGHBI, H.Y. Spinocerebellar ataxia type 1. **Clin Neurosci**. 3(1):5-11. 1995

Apêndice

APÊNDICE

Tabela 2. Participação de receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via administração	“Face rubbing” (s)
Controle normal	-	16,20 $\pm$ 3,40
Controle capsaicina	-	88,00 $\pm$ 7,40 ^a
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	19,00 $\pm$ 0,58 ^b
Capsazepina	5 mg/kg / i. p.	40,00 $\pm$ 3,51 ^b
Capsazepina + β -Amirina	5 mg/kg / i. p. + 30 mg/kg, v.o.	45,33 $\pm$ 2,67 ^{a, c}

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de “face rubbing” (coçar ou esfregar o focinho) durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle normal e controle capsaicina (ambos: água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (30 mg/kg, v.o.). Capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina. O grupo controle normal (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) foi analisado nos mesmos parâmetros dos demais, porém não foi submetido à administração de capsaicina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,05$: ^a vs. Controle normal; ^b vs. Controle capsaicina; ^c vs. β -Amirina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

Tabela 3. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / via de administração	“Face rubbing” (s)
Controle normal	-	16,20 $\pm$ 3,40
Controle capsaicina	-	88,00 $\pm$ 7,40 ^a
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	19,00 $\pm$ 0,58 ^b
Morfina	5 mg/kg / s.c.	8,25 $\pm$ 0,75 ^b
Naloxona + β -Amirina	1 mg/kg / i. p. + 30 mg/kg, v.o.	43,14 $\pm$ 3,86 ^c
Naloxona + Morfina	1 mg/kg / i. p. + 5 mg/kg, s.c.	34,00 $\pm$ 3,21 ^d

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de “face rubbing” (coçar ou esfregar o focinho) durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal. capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle normal, controle capsaicina (composição de ambos: água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina, e 30 min após o tratamento com morfina. Ao grupo controle normal não foi administrada capsaicina. Naloxona foi administrada 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais / grupo. $p < 0,05$: ^a vs. Controle normal; ^b vs. Controle capsaicina; ^c vs. β -Amirina; ^d vs. Morfina. (ANOVA seguido por Teste de Tukey).

Tabela 7. Estudo da ação de β -amirina no modelo de dor ocular induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	“Eye wiping” (s)
Controle	-	43,00 $\pm$ 2,70
	3 mg/kg / v.o.	33,60 $\pm$ 1,36 ^a
β -Amirina	10 mg/kg / v.o.	22,50 $\pm$ 2,75 ^a
	30 mg/kg / v.o.	16,00 $\pm$ 0,58 ^a
	100 mg/kg / v.o.	17,25 $\pm$ 2,39 ^a

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle. (ANOVA – um via, seguido por Teste de Dunnett).

Tabela 8. Participação do mecanismo opióide na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	“Eye wiping” (s)
Controle	-	54,50 $\pm$ 4,05
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	16,00 $\pm$ 0.58 ^a
Morfina	5 mg/kg / s.c.	7,25 $\pm$ 0.48 ^a
Naloxona	1 mg/kg / i.p.	48,00 $\pm$ 3,60
Naloxona + β -Amirina	1 mg/kg / i.p. + 30 mg/kg / v.o.	60,60 $\pm$ 5,02 ^b
Naloxona + Morfina	1 mg/kg / i.p. + 5 mg/kg / s.c.	33,50 $\pm$ 3,75 ^c

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -Amirina (30 mg/kg, v.o.) e 30 minutos após morfina (5 mg/kg, s.c.). A naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina e de morfina. Foram utilizados 8 animais por grupo. $p < 0,05$: ^a vs. Controle; ^b vs. β -Amirina; ^c vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

Tabela 9. Participação dos receptores TRPV1 na ação antinoceptiva de β -amirina no modelo de dor ocular “eye wiping test”, induzida por capsaicina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg) / Via de administração	“Eye wiping” (s)
Controle	-	43,00 $\pm$ 2,70
β -Amirina	30 mg/kg / v.o.	16,00 $\pm$ 0,58 ^a
Capsazepina	5 mg/kg / i.p.	50,60 $\pm$ 5,74
Capsazepina+ β -Amirina	5 mg/kg / i.p. + 30 mg/kg / v.o.	51,60 $\pm$ 0,51 ^b

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de esfregar o olho pelo período de 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) no olho direito do animal. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (30 mg/kg, v.o.). A capsazepina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,01$ vs. Controle; ^b $p < 0,001$ vs. β -Amirina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Tukey).

Tabela 10. Efeito de β -amirina na dor orofacial induzida por capsaicina, em animais diabéticos: participação de receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	“Face rubbing” (s)
Controle Normal	-	43,00 $\pm$ 2,70
Controle Diabético	-	48,00 $\pm$ 2,48
	10	47,50 $\pm$ 7,44
β -Amirina	30	14,60 $\pm$ 2,29 ^a
	100	15,50 $\pm$ 5,11 ^a
Morfina	5	1,25 $\pm$ 0,25 ^a
Naloxona + β -Amirina	1 + 30	6,50 $\pm$ 3,17
Naloxona + Morfina	1 + 5	18,75 $\pm$ 8,18

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do tempo, em segundos, de expressão do comportamento de coçar a face e/ou focinho durante 10 minutos após a administração da capsaicina (20 μ L, 1.5 μ g, s.c.) na vibrissa direita do animal diabético. Capsaicina foi administrada 1h após os tratamentos com os grupos: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.). Naloxona (1 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 minutos antes de β -amirina 30 mg/kg e morfina. Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. Controle diabético. (ANOVA seguido por Teste de Tukey).

Tabela 15. Efeito da dose-resposta de morfina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos.

Grupos	Dose	“Face rubbing” (s)	
		1 ^a Fase (0-5 min)	2 ^a Fase (20-30 min)
Controle	-	66,50±4,18	80,43±9,90
	2,5	35,17±4,50 ^a	29,20±8,29 ^a
Morfina	5,0	9,83±5,06 ^a	7,00±3,44 ^a
	7,5	1,83±1,25 ^a	1,57±1,50 ^a

Os valores representam a média ± E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1^a Fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2^a Fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20µL/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 30 minutos dos tratamentos com as doses de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/kg de morfina, via sub-cutânea. Um grupo controle (salina, s.c.) foi utilizado. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,01 vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnet).

Tabela 17. Efeito do triterpeno β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	“Face rubbing” (s)	
		1 ^a Fase (0-5 min)	2 ^a Fase (20-30 min)
Controle	-	73,89 $\pm$ 3,28	79,74 $\pm$ 4,19
	3	58,17 $\pm$ 5,48 ^a	55,40 $\pm$ 9,49
β -Amirina	10	39,80 $\pm$ 3,57 ^a	51,44 $\pm$ 6,70 ^a
	30	30,89 $\pm$ 1,50 ^a	24,44 $\pm$ 4,75 ^a
	100	26,00 $\pm$ 1,02 ^a	39,20 $\pm$ 9,35 ^a
Morfina	5	2,86 $\pm$ 1,14 ^a	1,75 $\pm$ 1,61 ^a

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1^a Fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2^a Fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 60 minutos dos tratamentos com as doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg de β -Amirina, via oral. Um grupo controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) foi utilizado como controle negativo e, como controle positivo, o grupo morfina (5 mg/kg, s.c.) também foi introduzido. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,01$ vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Dunnet).

Tabela 18. Avaliação do efeito de β -amirina no modelo de dor orofacial induzida por formalina, em camundongos: análise de efeito cumulativo da associação de β -amirina + morfina e participação dos receptores opióides.

Grupos	Dose (mg/kg)	“Face rubbing” (s)	
		1ª Fase (0-5 min)	2ª Fase (20-30 min)
Controle	-	92,75 $\pm$ 6,16	96,88 $\pm$ 9,96
β -Amirina	30	24,67 $\pm$ 3,18 ^a	44,00 $\pm$ 11,68*
	30 + 3	4,33 $\pm$ 1,89 ^a	10,06 $\pm$ 3,81*
β -Amirina + Morfina	15 + 1,5	4,50 $\pm$ 2,14 ^a	2,30 $\pm$ 1,37*
	7,5 + 0,75	26,20 $\pm$ 6,24 ^a	2,60 $\pm$ 2,11*
Morfina	3	10,00 $\pm$ 4,51 ^a	3,40 $\pm$ 2,44*
Naloxona + β -Amirina	1 + 30	68,71 $\pm$ 4,12 ^b	101,2 $\pm$ 13,62 ^a
	1 + (30 + 3)	87,00 $\pm$ 6,80 ^c	78,80 $\pm$ 9,69 ^b
Naloxona + (β -Amirina + Morfina)	1 + (15 + 1,5)	76,50 $\pm$ 6,59 ^c	72,60 $\pm$ 7,08 ^b
	1 + (7,5 + 0,75)	36,50 $\pm$ 3,88 ^c	69,75 $\pm$ 9,98 ^b
Naloxona + Morfina	1 + 3	80,89 $\pm$ 5,09 ^d	90,00 $\pm$ 11,35 ^a

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. da resposta de coçar o focinho no modelo de dor orofacial induzida por formalina em camundongos. A análise foi realizada em duas fases: a 1ª Fase, compreendida entre 0 e 5 minutos da administração de formalina e a 2ª Fase, no período de 20 a 30 minutos após. A formalina 0,05% (20 μ L/animal) foi aplicada na vibrissa direita dos camundongos após 60 minutos dos tratamentos com β -amirina (30 mg/kg, v.o.) e controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.) e 30 minutos após o grupo morfina (5 mg/kg, s.c.). A associação de β -amirina e morfina seguiu ao seguinte critério de dosagem: DE₅₀ (30 + 3 mg/kg) de cada droga, DE₂₅ (15 + 1,5 mg/kg) e DE_{12,5} (7,5 + 0,75 mg/kg). A morfina foi administrada após 30 minutos da β -amirina e 30 minutos depois a formalina foi aplicada na vibrissa do animal. O antagonismo opióide foi estudado com o pré-tratamento, 15 minutos antes da dose de cada grupo, com naloxona (2 mg/kg, i.p.). Foram utilizados 8 animais por grupo. p<0,05: ^a vs. Controle; ^b vs. β -Amirina; ^c vs. associação de β -Amirina + Morfina; ^d vs. Morfina. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de Bonferroni).

Tabela 20. Efeito de β -Amirina na dor visceral induzida por ácido acético.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de contorções abdominais (20 min)	% de Proteção
Controle	-	40,60 $\pm$ 3,51	-
	10	30,33 $\pm$ 3,03	25,29
β -Amirina	30	13,00 $\pm$ 0,91 ^a	67,98
	100	8,83 $\pm$ 1,72 ^a	78,25
Morfina	5	1,40 $\pm$ 0,40 ^a	96,55

Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. do número de contorções, no período de 20 minutos, após a administração de ácido acético 0,6%, representadas pela expressão de dor visceral de contorcer o corpo, estiramento das patas superiores e inferiores. Os grupos testados foram: controle (água destilada + 0,05% Tween 80, v.o.), β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a p<0,05 vs. Controle. (ANOVA – uma via, seguido por Teste de múltipla comparação de Tukey).