



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

**MARÍLIA LEITE DIAS**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA RIPARINA IV: PARTICIPAÇÃO**  
**DOS RECEPTORES TRPV1, TRPM8, RECEPTORES**  
**GLUTAMATÉRGICOS E DO ÓXIDO NÍTRICO**

**FORTALEZA**

**2012**

**MARÍLIA LEITE DIAS**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA RIPARINA IV: PARTICIPAÇÃO DOS  
RECEPTORES TRPV1, TRPM8, RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS E DO  
ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- D533a      Dias, Marília Leite.  
Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico/ Marília Leite Dias. – 2012.  
80 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
1. Lauraceae 2. Nociceptividade 3. Canais de cátion TRPV 4. Canais de cátion TRPM 5. Glutamatos 6. Óxido Nítrico I. Título.

---

CDD 615.32

**MARÍLIA LEITE DIAS**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA RIPARINA IV: PARTICIPAÇÃO DOS  
RECEPTORES TRPV1, TRPM8, RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS E DO  
ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação apresentada a Coordenação do  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Farmacologia.

**Aprovada em**   /   /

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior**  
**Universidade Federal do Ceará**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar junto a mim em todos os momentos, guiando a minha existência e iluminando os meus caminhos, fazendo-me mais forte e mais cristã, e concedendo-me a graça de viver em sua presença.

Aos meus pais, Edna Maria Leite Dias e Joaquim Tavares Dias, que nunca mediram esforços no auxílio da minha educação, incentivando-me a buscar novos horizontes e trilhar o caminho correto, e que me transmitiram valores que carregarei por toda a vida.

Ao meu irmão Germano pelos momentos felizes que vivemos quando estamos juntos e pelo seu apoio e preocupação comigo.

Ao meu amado noivo Rafael, por toda a paciência, amor, dedicação e compreensão que tem devotado a mim. Por ser um exemplo de conduta como profissional e ser humano, e pelas lições de paciência, generosidade e humanismo que tenho aprendido contigo.

À Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, que me acolheu como orientanda e me ajudou a trilhar esse caminho, sempre com muita paciência e alegria.

À Prof. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles por todo apoio e incentivo, e pelos momentos de aconselhamento e iluminação.

Aos meus companheiros de experimento, amigos e verdadeiros anjos da guarda Alyne Mara, Leonardo Freire, Emiliano Rios e Nayrton Flávio, que estiveram sempre ao meu lado me ajudando, aconselhando e compartilhando momentos mais que especiais. Sem vocês por perto, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Às minhas amigas da Pós-Graduação Vlória Moreira e Taciana Rodrigues, que se tornaram verdadeiras companheiras e estavam sempre dispostas a compartilhar todos os momentos da nossa caminhada profissional, e também pessoal.

Aos amigos do LNF Patrícia Xavier, Maria Izabel, Luciana, Maria do Carmo, Natália, Íris, Mariana Fernandes, Mariana Feitosa, pelos momentos compartilhados durante os experimentos ou nas horas de descontração.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, na pessoa do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, e ao Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez, que isolaram, purificaram e gentilmente nos cederam a substância que representa peça chave desta dissertação de mestrado.

Aos funcionários do LNF Maria Vilany, Lena e Arnaldo, pelo auxílio nos momentos em que necessitei de sua ajuda.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia incluindo Aura Rhanes, Márcia, Alana, Ana Paula, Fernando, Haroldo, Cícera pela dedicação ao trabalho

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro

Agradeço a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento pessoal e profissional.

## RESUMO

A Riparina IV, uma alcanida sintetizada de *Aniba riparia*, foi testada em modelos animais padronizados de dor, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Foram utilizados camundongos *Swiss* (20-30g), e a Riparina IV foi administrada de forma aguda em todos os testes, nas doses de 25 e 50 mg/kg, por via oral. Foram utilizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético; placa quente; teste da formalina; hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina; teste da nocicepção induzida por capsaicina, cinamaldeído, mentol; teste da nocicepção induzida por glutamato, bem como em modelos comportamentais que permitam excluir a possibilidade de uma atividade relaxante muscular ou induzir resultados falso-positivos nos modelos anteriores, tais como testes do campo aberto e rota Rod. Os resultados demonstraram que a Riparina IV possui uma atividade antinociceptiva no modelo de nocicepção visceral induzida por ácido acético. A Riparina IV não demonstrou atividade no modelo de nocicepção térmica da placa quente. O pré-tratamento com a Riparina IV reduziu significativamente a nocicepção inflamatória induzida pela segunda fase da formalina, porém não alterou a nocicepção neurogênica induzida pela primeira fase do teste da formalina. Os animais pré-tratados com a Riparina IV também exibiram uma redução significativa na hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina. Em relação à participação dos receptores de potencial transitório (TRP), a Riparina IV demonstrou atividade nos modelos de nocicepção induzida pela administração de capsaicina e mentol, porém não apresentou atividade na nocicepção induzida por cinamaldeído. Também reduziu a nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Para o estudo dos mecanismos de ação da Riparina IV foi utilizada somente a dose de 50 mg/kg da substância. Na avaliação da participação dos canais de potássio ATP-dependentes, o pré-tratamento com glibenclamida não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva da Riparina IV, descartando-se o seu envolvimento; da mesma forma, o pré-tratamento com ioimbina, um antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico, e pCPA, um depletor das reservas de serotonina, também não foram capazes de reverter tal ação, não havendo envolvimento com o mecanismo de ação da Riparina IV. O pré-tratamento com L-arginina, um precursor do óxido nítrico, reverteu a ação antinociceptiva da Riparina IV, sugerindo, em parte, a participação da via do óxido nítrico no seu mecanismo de ação. Os resultados mostraram que essa substância não alterou a atividade locomotora no teste do campo aberto, nem diminuiu o número de quedas no teste do rota Rod, descartando a possibilidade de haver sedação ou incoordenação motora por parte da Riparina IV. Em síntese, os resultados demonstraram que a Riparina IV possui uma atividade em modelos animais de nocicepção, possivelmente envolvendo os receptores TRPV1, TRPM8, glutamatérgicos e a via do óxido nítrico.

Palavras chave: Riparina IV. Nocicepção. TRPV1. TRPM8. Glutamate. Óxido nítrico.

## ABSTRACT

Riparin IV, an alkalamide synthesized from *Aniba riparia*, was tested in standard animal models of pain, as well as the possible mechanisms of action involved. It was used Swiss mice (20-30g), and Riparin IV was administered acutely in all tests, at the doses of 25 and 50 mg/kg, by gavage. It was used the tests of abdominal writhing induced by acetic acid, hot plate test, formalin test, mechanical hypernociception induced by carrageenan, nociception test induced by capsaicin, cinnamaldehyde and menthol, nociception test induced by glutamate, as well as models of behavior that ruled out the possibility of a muscle relaxing activity or induce false-positive results in previous models, such as the open field test and the rota Rod test. The results showed that Riparin IV has an antinociceptive activity at the model of visceral nociception induced by acetic acid. Riparin IV did not show any activity at the hot plate thermal nociception model. Pretreatment with Riparin IV reduced significantly the inflammatory nociception induced at the second phase of formalin test, but did not alter the neurogenic nociception induced at the first phase of formalin test. The animals pretreated with Riparin IV also exhibited a significant reduction at the mechanical hypernociception induced by carrageenan. Related to the participation of the Transient Potential Receptors (TRP), Riparin IV showed an activity at the models of nociception induced by capsaicin and menthol, but did not show any activity at the nociception induced by cinnamaldehyde. Also reduced the nociception induced by administration of glutamate at the hind paw. To study the mechanisms of action of Riparin IV, it was used only the dose of 50 mg/kg of the substance. At the evaluation of participation of the ATP-dependent potassium channels, pretreatment with glibenclamide was not able to reverse the antinociceptive action of Riparin IV, discharging its involvement; at the same way, pretreatment with yohimbine, an  $\alpha_2$ -adrenergic antagonist, and pCPA, a depletor of the serotonin reservoirs, were not able to reverse such action, not having any involvement with the mechanism of action of Riparin IV. Pretreatment with L-arginine, a precursor of Nitric Oxide, reversed the antinociceptive action of Riparin IV, suggesting, in part, the participation of nitric oxide pathway at the mechanism of action. The results showed that this substance did not alter the locomotor activity at the open field test, neither diminished the number of falls at the rota Rod test, discharging the possibility of sedation or incoordination by Riparin IV. In summary, the results showed that Riparin IV has an action in animal models of nociception, possibly involving the receptors TRPV1, TRPM8, glutamatergic receptors and the nitric oxide pathway.

Key words: Riparin IV. Nociception. TRPV1. TRPM8. Glutamate. Nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	Vias ascendentes da dor	<b>20</b>
<b>2</b>	Evolução do ácido salicílico natural para a aspirina sintética e o subsequente desenvolvimento de várias drogas antiinflamatórias não-esteroidais e de inibidores da ciclooxigenase-2	<b>29</b>
<b>3</b>	Estrutura química das Riparinas I, II, III e IV	<b>31</b>
<b>4</b>	Efeito da administração oral de riparina IV e indometacina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	<b>42</b>
<b>5</b>	Efeito da Riparina IV e morfina sobre o tempo de lambadura (s) da pata direita traseira na primeira (0-5 minutos) e segunda fase (20-25 minutos) no teste da nocicepção induzida pela formalina.	<b>44</b>
<b>6</b>	Efeito da administração do veículo, Riparina IV ou indometacina na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina	<b>45</b>
<b>7</b>	Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambadura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato	<b>46</b>
<b>8</b>	Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambadura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina	<b>47</b>
<b>9</b>	Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambadura da pata direita traseira no modelo de nocicepção induzida pelo cinamaldeído	<b>48</b>
<b>10</b>	Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambadura da pata no modelo de nocicepção induzida pelo mentol	<b>49</b>
<b>11</b>	Efeito da Riparina IV sozinha ou associada com Glibenclamida sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	<b>50</b>
<b>12</b>	Efeito da Riparina IV sozinha ou associada com pCPA sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	<b>51</b>
<b>13</b>	Efeito da Riparina IV sozinha ou associada com Ioimbina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	<b>52</b>
<b>14</b>	Efeito da Riparina IV sozinha ou associada com L-arginina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	<b>53</b>

<b>15</b>	Efeito da Riparina IV e do Diazepam sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) no teste do campo aberto	<b>55</b>
-----------	--	-----------

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>1</b>	Receptores de potencial transitório homólogos ao TRPV1	<b>25</b>
<b>2</b>	Efeito da Riparina IV sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente	<b>43</b>
<b>3</b>	Efeito da Riparina IV sobre o número de quedas no teste da barra giratória	<b>54</b>
<b>1</b>	Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção	<b>27</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau(s) Centigrado(s)
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
>	Maior
<	Menor
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μmol	Micromol
2-APB	2-aminoethoxydiphenylborate
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ALE	Atividade locomotora espontânea
AMPA	Ácido 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propanóico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ASICs	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ASIC 1	Canais iônicos sensíveis ao ácido 1
ASIC 4	Canais iônicos sensíveis ao ácido 4
BK	Bradicinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenase
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro Padrão da Média
g	Gramma
GDNF	Células gliais derivadas de fator neurotrófico
Il	Interleucina
i.p.	Intraperitonal
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro

mM	Milimolar
ms	Metros por segundo
NGF	Fator de crescimento neural
NK1	Neuroquinina 1
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
P	Nível de significância
P2X3	Receptor purinérgico 3
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
pCPA	p-clorofenilalanina
pH	Potencial hidrogeniônico
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina da série E2
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina da série F do tipo 2
PKC	Proteína quinase C
RPM	Rotações por minuto
S	Segundo
s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P
SMT	Trato espinomesencefálico
SNC	Sistema nervoso central
SRT	Trato espinoreticular
STT	Trato espinotalâmico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRKA	Receptor de Tirosina Quinase tipo A
TRPA	Receptor de Potencial Transitório do tipo Anquirina
TRPA 1	Receptor de Potencial Transitório do tipo Anquirina 1
TRPC	Receptor de Potencial Transitório do tipo Canônico
TRPM	Receptor de Potencial Transitório do tipo Melastatina
TRPM 8	Receptor de Potencial Transitório do tipo Melastatina 8
TRPML	Receptor de Potencial Transitório do tipo Mucolipina
TRPP	Receptor de Potencial Transitório do tipo Policistina
TRPV	Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide
TRPV 1	Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 1

TRPV 2	Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 2
TRPV 3	Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 3
TRPV 4	Receptor de Potencial Transitório do tipo Vanilóide 4
VLf	Funículo ventrolateral
v.o.	Via oral
VR1	Receptor do tipo vanilóide 1
VS	Versus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>1.1 PARTE I</b>	16
1.1.1 Dor	16
1.1.1.1 Classificação dos tipos de dor	17
1.1.1.2 Caminhos da dor	18
1.1.2 Nocicepção	21
1.1.2.1 Receptores envolvidos na nocicepção	24
1.1.2.2 Mediadores químicos e nocicepção	26
<b>1.2 PARTE II</b>	<b>28</b>
1.2.1 A importância dos produtos naturais na síntese de novas moléculas	28
1.2.2 <i>Aniba riparia</i> e as riparinas	30
1.3 Relevância e justificativa	32
<b>2 OBJETIVOS</b>	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
3.1 Obtenção do Material	34
3.2 Drogas e Reagentes	34
3.3 Equipamentos e Materiais	35
3.4 Animais Experimentais	35
3.5 Testes de Atividade Antinociceptiva	36
3.5.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	36
3.5.2 Teste da Placa Quente	36
3.5.3 Teste da Formalina	36
3.5.4 Teste da Hipernocicepção Mecânica Induzida por Carragenina	37
3.5.5 Participação dos receptores glutamatérgicos	37
3.5.5.1 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Glutamato	37
3.5.6 Participação dos Receptores de Potencial Transitório (TRP)	38
3.5.6.1 Teste da Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Capsaicina	38
3.5.6.2 Teste da Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Cinamaldeído	38
3.5.6.3 Teste da Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Mentol	39
3.5.7 Estudo dos Possíveis Mecanismos de Ação Envolvidos	39
3.5.7.1 Participação dos Canais de Potássio Dependentes de ATP	39
3.5.7.2 Participação dos Receptores Serotonérgicos	39

3.5.7.3 Participação dos Receptores $\alpha$ 2-adrenérgicos	40
3.5.7.4 Participação do óxido nítrico	40
3.6 Testes de Atividade Locomotora	40
3.6.1 Teste do Campo Aberto	40
3.6.2 Avaliação da Capacidade Locomotora na Barra Giratória (Rota Rod)	40
<b>4 RESULTADOS</b>	42
4.1.1 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de contorções abdominais induzidas por Ácido Acético	42
4.1.2 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nocicepção térmica na placa quente	43
4.1.3 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nocicepção induzida pela formalina	44
4.1.4 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina	45
4.1.5 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos na ação antinociceptiva da Riparina IV	46
4.1.6 Participação dos Receptores de Potencial Transitório (TRP)	47
4.1.6.1 Avaliação da Participação dos Receptores TRPV1 na Ação Antinociceptiva da Riparina IV	47
4.1.6.2 Avaliação da Participação dos Receptores TRPA1 na Ação Antinociceptiva da Riparina IV	48
4.1.6.3 Avaliação da Participação dos Receptores TRPM8 na Ação Antinociceptiva da Riparina IV	49
4.1.7 Investigação sobre os Possíveis Mecanismos de Ação Antinociceptiva da Riparina IV	50
4.1.7.1 Investigação do Envolvimento dos Canais de Potássio Dependentes de ATP no Efeito Antinociceptivo da Riparina IV	50
4.1.7.2 Investigação do Envolvimento dos Receptores Serotonérgicos no Efeito Antinociceptivo da Riparina IV	51
4.1.7.3 Investigação do Envolvimento dos Receptores $\alpha$ 2-adrenérgicos no Efeito Antinociceptivo da Riparina IV	52
4.1.7.4 Investigação do Envolvimento do óxido nítrico no Efeito Antinociceptivo da Riparina IV	53

4.2 Avaliação da Atividade Locomotora	54
4.2.1 Teste da Barra Giratória (rota Rod)	54
4.2.2 Teste do Campo Aberto	54
<b>5 DISCUSSÃO</b>	56
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	67
<b>7 CONCLUSÃO</b>	68
<b>REFERÊNCIAS</b>	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PARTE I

### 1.1.1 Dor

Em 22 de maio de 2012, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) atualizou o conceito de dor, definindo-o como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual potencial ou real, ou descrita em termos de tal lesão”.

A experiência dolorosa resulta da interpretação do aspecto físico-químico do estímulo nocivo e da sua interação com fatores emocionais e culturais individuais que estejam, de alguma forma relacionados à dor, tais como o humor, experiências anteriores, crenças, atitudes, conhecimento, significado simbólico atribuído à queixa dolorosa, entre outros. A apreciação da dor é uma experiência privada e subjetiva que não resulta apenas das características da lesão tecidual. Na apreciação do fenômeno algico, aspectos sensoriais, afetivos e sócio-culturais estão imbricados de modo indissociável. (MELKACK; WALL, 1991; PIMENTA; PORTINOI, 1999).

A dor é necessária para a sobrevivência do organismo e também para manter a sua integridade, e pode ser classificada em nociceptiva ou neuropática. A dor nociceptiva resulta de uma atividade nas vias neuronais causada por estímulos que provocam danos reais ao tecido ou estímulos potencialmente danosos aos tecidos, como nos casos de dores em processos pós-cirúrgicos, artrite e dor associada a lesões provocadas por práticas esportivas. Já a dor neuropática é iniciada por lesões ou disfunções do sistema nervoso e pode ser mantida através de vários mecanismos, como excesso de estimulação das vias nociceptivas ou dano às vias inibitórias (HUNT; MANTYH, 2001; NICHOLSON, 2006).

### 1.1.1.1 Classificação dos tipos de dor

A dor nociceptiva pode ser dividida em aguda e crônica: a dor aguda está relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias; há expectativa de desaparecimento após a cura da lesão; a delimitação temporal-espacial é precisa e há respostas neurovegetativas associadas, como elevação da pressão arterial, taquicardia ou taquipnéia. (PIMENTA, 1999).

A dor aguda é um fenômeno mundial. Cirurgias eletivas e de emergência, doenças graves, trauma do parto, queimaduras, calamidades naturais, guerras e tortura, tudo contribui para o seu advento. Quando não aliviada, comumente provoca alterações fisiopatológicas neurais, incluindo sensibilização neural periférica e central, que podem evoluir para síndromes de dor crônica (BRENNAN *et al.*, 2007).

Dor crônica é aquela que não desaparece após a cura da lesão ou que está relacionada a processos patológicos crônicos. Não tem mais a função biológica de alerta e, em geral, não há respostas neurovegetativas associadas ao sintoma. É mal delimitada no tempo e no espaço e ansiedade e depressão são respostas emocionais frequentemente associadas ao quadro. (PIMENTA, 1999).

A dor crônica pode gerar uma série de sintomas, como mobilidade reduzida e conseqüente perda de força, sono perturbado, comprometimento imune e aumento da susceptibilidade à doença, dependência de medicação, e co-dependência com membros da família e outros cuidadores. (BRENNAN *et al.*, 2007).

Pacientes acometidos com dor crônica sofrem muita influência de estressores psicossociais e socioeconômicos, depressões recorrentes e se beneficiam com o tratamento com antidepressivos. Queixas dolorosas podem desencadear medo, dependência ou mesmo comportamentos para obtenção de benefícios que surgem com o adoecimento. Em alguns casos, o sofrimento relacionado à dor domina o quadro clínico e a síndrome depressiva associada só é reconhecida meses ou, muitas vezes, anos após (TEIXEIRA, 2006).

Kreling *et al.* (2006) realizaram um estudo epidemiológico em uma população do sul do Brasil e evidenciaram a alta prevalência das dores crônicas, onde 61,4% da população estudada relatou acometimento de dor crônica, de acordo com os critérios preconizados pela IASP. Destacou-se a alta prevalência de indivíduos do sexo feminino, compreendendo 69,2% da amostra de pacientes. Esse estudo demonstrou a importância das dores crônicas, especialmente as cefaléias e dores lombares, como possíveis determinantes de prejuízos pessoais e sociais.

Embora o limiar de percepção a dor seja muito semelhante entre os indivíduos, a tolerância à dor varia muito e está relacionada a fatores sensoriais (extensão e localização da lesão), fatores genéticos (relativos ao sistema nociceptivo e da modulação da dor), emocionais (medo, raiva, ansiedade e depressão), culturais (aprendizagem, experiências anteriores, significado simbólico da dor), e sociais (possíveis ganhos secundários de ordem econômica, social e afetiva). (PIMENTA; PORTINOI, 1999).

O estudo das diferenças individuais de resposta à dor tornou-se mais avançado com o advento da tecnologia em pesquisa genética. Múltiplos genes, cada um com uma pequena influência individual, interagem entre si e com uma variedade de fatores ambientais, influenciando na sensibilidade à dor e na expressão de condições ligadas à dor crônica; porém, quais genes contribuem para a grande variedade de respostas à dor clínica e experimental, e a função direta dos polimorfismos genéticos específicos são questões ainda não elucidadas. (FILLINGIM *et al.*, 2008).

### **1.1.1.2 Caminhos da dor**

A compreensão do fenômeno da dor está relacionada a três mecanismos: transdução, transmissão e modulação. A transdução trata-se da ativação dos nociceptores por um estímulo nódico, sendo esse mecânico, térmico ou químico. A transmissão trata-se da condução das informações relativas à nocicepção da periferia para o sistema nervoso central, e constitui a primeira linha de defesa a fim de minimizar os danos ao organismo. A modulação compreende a inibição ou facilitação das informações nociceptivas da periferia para o sistema nervoso central, através de vias que descendem do cérebro para a medula espinhal. A inibição descendente ocorre em qualquer momento da transmissão do impulso nervoso, e três mecanismos podem descrever essa modulação: a teoria do controle do portão, o sistema

descendente inibitório e o controle inibitório produzido em outros centros do SNC. (PORTO, 2004).

A propagação da dor é iniciada com a ativação de receptores fisiológicos denominados nociceptores, que são amplamente encontrados na pele, músculos, mucosas, tendões, tecido conectivo de órgãos viscerais, fâscias profundas, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo e veias arteriais. Os receptores correspondem a terminações nervosas livres e representam a parte mais distal de um neurônio aferente (HUNT; MANYTH, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

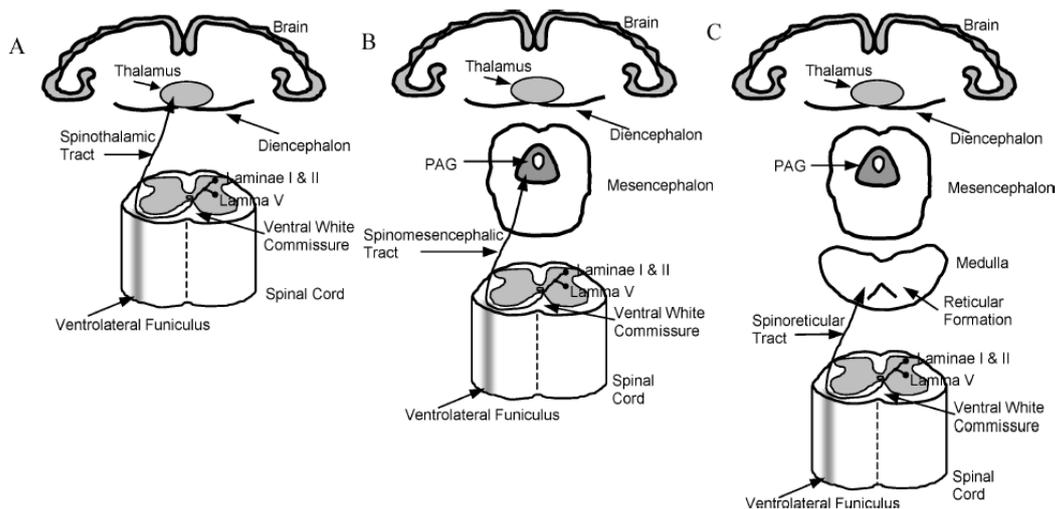
A transmissão ocorre após a deflagração de um estímulo doloroso capaz de ativar um número suficiente de nociceptores, produzindo um estímulo aferente. Esse estímulo se propaga ao longo de fibras primárias até o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre a sinapse com neurônios de segunda ordem - predominantemente na região da lâmina II (substância gelatinosa) - e propagam a mensagem nociceptiva através da liberação de uma grande variedade de neurotransmissores, como o aminoácido excitatório glutamato ou do peptídeo substância P. Os neurônios de segunda ordem, então, cruzam a medula espinhal e ascendem ao trato espinotalâmico, onde projetam as suas fibras terminais, especialmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios para diversas regiões, caracterizando diferentes vias ascendentes (RUSSO; BROSE, 1998; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

As vias ascendentes mais significantes em primatas, incluindo o homem, ascendem do cordão espinhal até o cérebro no quadrante ântero-lateral. Dentre estas vias, as que demonstram maior participação na mediação da dor são os tratos espinotalâmico (STT), espinomesencefálico (SMT) e espinoreticular (SRT) (WILLIS, 1985).

O trato espinotalâmico é a via mais comumente relacionada à dor, sendo descritas três formas de aferências no trato espinotalâmico: a via neoespinotalâmica, ou trato espinotalâmico ventral, que participa do componente sensório-discriminativo da dor; a via paleoespinotalâmica, ou via do trato espinotalâmico dorsal que está envolvida nos aspectos afetivo-motivacionais da dor; e a via espinotalâmica, que representa o componente afetivo da experiência dolorosa (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; RENN; DORSEY, 2005).

O trato espinoreticular está envolvido nas características afetivo-motivacionais e nas respostas neurovegetativas à dor; o trato espinomesencefálico poderia ser considerado como um componente do trato espinoreticular, porém há diferenças organizacionais suficientes para justificar a separação dos locais em espinomesencefálico e espinoreticular. A estimulação das regiões inervadas pelo trato espinomesencefálico produz repostas diferentes implicadas no processo nociceptivo, podendo provocar comportamentos aversivos na presença de um estímulo nocivos e repostas motoras, como deserção visual, bem como repostas autonômicas, cardiovasculares, motivacionais e afetivas (WILLIS, 1985; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; RENN; DORSEY, 2005). (**Figura 1**)

**Figura 1. Vias ascendentes da dor**



(A) Trato espinotalâmico (STT). As projeções neuronais que formam o STT se originam predominantemente nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios do STT cruzam a linha média através da comissura branca ventral até o quadrante ventrolateral oposto da medula espinhal. No quadrante ventrolateral, os neurônios do STT ascendem da corda espinhal para o tálamo no funículo ventrolateral (VLF). (B) Trato espinomesencefálico (SMT). Os neurônios que formam o SMT se originam predominantemente nas lâminas I, II e V do corno dorsal. Os neurônios do SMT decussam através da comissura branca ventral para o VLF, onde ascendem do cordão espinhal para o mesencéfalo e terminam em várias estruturas, como a substância cinza periaquedutal (PAG). (C) Trato espinoreticular (SRT). Os neurônios do SRT se originam predominantemente nas lâminas I, II, e V do corno dorsal, decussam através da comissura branca ventral até o funículo ventrolateral e ascendem da corda espinhal para a formação reticular da medula.

Fonte: RENN; DORSEY, 2005.

Em resposta à estimulação nociceptiva ascendente, ocorre ativação de algumas vias descendentes de controle, modulando o sinal nociceptivo. Algumas teorias foram propostas na tentativa de elucidar os mecanismos de modulação da dor, sendo duas destas muito conhecidas.

Uma das teorias mais famosas sobre a modulação da dor foi postulada por Melzack e Wall em 1965, conhecida como a teoria do controle do portão. De acordo com os autores, o corno dorsal da medula espinhal apresenta “portões” que são capazes de determinar quais influências convergentes, provenientes dos receptores sensíveis a estímulos nocivos, táteis ou térmicos seriam transmitidas para o sistema nervoso central.

A base de outra teoria sobre modulação iniciou-se com a identificação da área cinzenta periaquedutal (PAG) como um local importante na produção da analgesia (REYNOLDS, 1969). Basabaum e Fields (1978, 1984) conseguiram elucidar o mecanismo pelo qual a PAG induz a analgesia. Segundo os autores, as células da PAG se projetam primariamente para o núcleo magno da rafe (NMR), que envia axônios para o corno dorsal da medula espinhal. Quando ativado, o NMR exerce uma atividade inibitória em rede no processo sensorial nociceptivo, provavelmente inibindo as células do corno dorsal superficiais e também aquelas mais profundas, que recebem entradas de receptores aferentes primários. Essa sistema linear de modulação é conhecido como controle descendente inibitório.

Atualmente, conceitua-se a modulação da dor como algo mais complexo, envolvendo a participação de importantes regiões corticais e elementos do sistema límbico, bem como locais do mesencéfalo e da medula espinhal (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

### **1.1.2 Nocicepção**

Sherrington (1906), introduziu o conceito de nocicepção a fim de diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor, propriamente dita. A nocicepção é a detecção de um estímulo agressivo por terminais sensoriais e a transmissão de informações sobre a presença e qualidade desse estímulo pelas conexões sinápticas das células transmissoras, do local estimulado até o cérebro, não havendo participação de um componente afetivo. Trata-se de uma sensação não uniforme, e é considerada a progenitora da dor. A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinadas por muitos fatores

dentro da medula espinhal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO; BROSE, 1998; MC GRATH, 1992).

Na presença de um estímulo nódico, os nociceptores aferentes primários demonstram diferentes padrões de propagação. Inicialmente, as fibras aferentes não-mielínicas foram relacionadas com a dor e reações associadas à mesma (ZOTTERMAN, 1933; LEWIS; POCHIN, 1937; GORDON; WHITTERIDGE, 1943), porém alguns estudos realizaram a mensuração do tempo de reação após a estímulo nódico, e demonstraram que a sensação de dor era referida tão rapidamente que não poderia ser mediada somente através de fibras não-mielínicas (BESSOU; PERL, 1969; BURGUESS; PERL, 1967).

Burguess e Perl (1967) realizaram um estudo capaz de provar que há uma base para um mecanismo associado à dor dependente da ativação de receptores específicos associados às fibras mielínicas. De acordo com os resultados obtidos, eles classificaram as fibras mielínicas em três grupos: o grupo de fibras nociceptivas, que respondeu somente a estímulos dolorosos aos humanos e nódicos na pele dos animais. Um segundo grupo, classificado como mecanorreceptores insensíveis, que pareceu similar ao grupo nociceptivo, porém as fibras foram excitadas por estímulos não dolorosos à maioria dos indivíduos observados. O terceiro grupo foi considerado de receptores de pressão moderada, e esses receptores tiveram as fibras aferentes de maior velocidade de condução dentre os três grupos observados.

Outro estudo realizado por Benson e Perl (1969), descreveu a existência de vários tipos de fibras C, dentre eles os receptores polimodais, que se tratavam de unidades de alto-limiar presentes em fibras não-mielínicas ativadas por estímulos mecânicos de moderados a intensos, calor nódico, irritantes químicos e também por temperaturas da pele muito baixas, ou seja, estímulos nódicos de qualquer tipo, justificando a denominação de receptores polimodais.

Harper e Lawson (1985) classificaram os neurônios aferentes primários com base na velocidade de condução, mensurada pela estimulação no nervo ciático de ratos. Células que eram capazes de conduzir em uma velocidade de 30-55 ms foram classificadas como neurônios A- $\alpha$ ; aquelas que conduziam em velocidade de 14-30 ms foram denominadas A- $\beta$ , e os neurônios que conduziam em velocidades de 2,2-8 ms, e que requereram pulsos de 0,1 m.s para atingir o limiar foram classificadas como A- $\delta$ . Neurônios que apresentavam axônios

com velocidade inferior à 1,4 ms e que requeriam estimulação de 1ms de duração foram classificadas como neurônios C.

Novas características das fibras responsáveis pela condução nervosa foram elucidadas. As fibras A- $\alpha$  e A- $\beta$  são células com os maiores diâmetros, mielínicas, de rápida condução, capazes de detectar estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações. A estimulação direta em qualquer frequência dessas fibras, em humanos, conduz rapidamente o estímulo, porém, não produzem sensações descritas como dolorosas (JULIUS; BASAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

As fibras A $\delta$  são mielínicas, de tamanho intermediário, e cuja velocidade de propagação do sinal aferente é mais rápida que as fibras do tipo C. São responsivas a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química. Essas fibras podem ser divididas em dois grupos: ambos respondem a estímulos mecânicos intensos, porém podem ser distinguidas através da ativação diferencial em resposta ao calor intenso ou a forma como são afetadas por lesão tecidual. As fibras A $\delta$  do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas em torno de 53 °C, já as fibras A $\delta$  do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C (JULIUS; BASBAUM, 2001; LAWSON, 2002; CRAIG, 2003; COUTAUX *et al.*, 2005).

As fibras C tratam-se de fibras não mielínicas de pequeno diâmetro, que respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química. Cerca de 60-90% dos neurônios aferentes primários, de origem cutânea ou de tecidos mais profundos correspondem a fibras do tipo C (LAWSON, 2002; COUTAUX *et al.*, 2005). Assim como as fibras A- $\delta$ , as fibras C são divididas em dois grupos: um grupo expressa o receptor de purinas P2X3, fator neurotrófico de células gliais (GDNF), e essas fibras terminam quase que exclusivamente em partes mais profundas da substância gelatinosa da medula espinhal; o outro grupo sintetiza peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), expressa o receptor TrkA, e terminam mais superficialmente no corno dorsal. Ambos os grupos de fibras C respondem a estímulos nocivos similares e expressam o receptor VR1, que traduz estímulos nocivos térmicos e químicos (HUNT; MANTYH, 2001).

Algumas fibras C são denominadas receptores silenciosos, pois os estímulos naturais são de difícil identificação; essas fibras são normalmente insensíveis à estimulação mecânica e térmica, e são recrutadas somente após injúria tecidual, podendo estar envolvidos na modificação da sensibilidade periférica que ocorre após o dano tecidual (JULIUS; BASAUM, 2001; HUNT; MANTYH, 2001).

### 1.1.2.1 Receptores envolvidos na transdução da nocicepção

Os receptores de potencial transitório (TRP) constituem uma das maiores famílias de canais iônicos. Baseada na homologia da sequência de aminoácidos, os membros da família TRP em mamíferos foram classificados em 6 subfamílias: TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA (Anquirina) (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007).

Os canais TRPV1 foram os primeiros a serem clonados. TRPV1 é sensível a uma variedade de estímulos, incluindo calor nocivo, prótons com pH abaixo de 6,5, e ligantes específicos tais como a capsaicina. São expressos em nociceptores e medeia dor aguda e crônica. Apresenta uma gama de substâncias com capacidade de antagonizar as ações desse canal iônico, como capsazepina e vermelho de rutênio (CATERINA *et al.*, 1997; TANG *et al.*, 2007).

Os canais TRPV2, TRPV3 e TRPV4 apresentam homologia com o receptor TRPV1, porém são ativados por diferentes substâncias, são insensíveis à capsaicina e apresentam variadas temperaturas de ativação. (**Tabela 1**)

**Tabela 1. Receptores de potencial transitório homólogos ao TRPV1**

<b>CANAL IÔNICO</b>	<b>HOMOLOGIA COM TRPV1</b>	<b>AGONISTA</b>	<b>TEMPERATURA DE ATIVAÇÃO</b>
TRPV2	49% na sequência de aminoácidos	2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB)	Igual ou superior a 52°C
TRPV3	43% na sequência de aminoácidos	Cânfora	Em torno de 33°C a 35°C
TRPV4	40% na sequência de aminoácidos	Soluções hipotônicas, ésteres de forbol	Em torno de 27°C a 34°C

Fonte: FEIN, 2011.

Similar ao receptor para o calor, TRPV1, existem dois receptores que detectam o frio. O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), chamado anteriormente de ANKTM1, é um canal não-seletivo permeável ao cálcio (STORY *et al.*, 2003) e ativado por temperaturas menores que 17 °C (PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009). O TRPM8 é ativado por temperaturas frias moderadas (15 a 25 °C) e por compostos que evocam uma sensação de frescor, como mentol, icilina, eucaliptol e eugenol.

Canais TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPM8 são comumente referidos como termoreceptores, e TRPV4 e TRPA1 como mecanoreceptores; porém, os canais TRP apresentam-se como receptores polimodais. Já os receptores de potencial transitório TRPV4 e TRPA1, são conhecidos também como termoreceptores (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007; BANDELL *et al.*, 2004; JORDT *et al.*, 2004; MCNAMARA *et al.*, 2007; REID; FLONTA, 2001; BEHRENDT *et al.*, 2004; CHUANG; NEUHAUSSER; JULIUS, 2004; PREMKUMAR *et al.*, 2005; BENEDIKT *et al.*, 2007).

Outra família que participa da transdução da nocicepção é a dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs). Estes canais são codificados por quatro genes, produzindo subunidades designadas de ASIC1 a ASIC4, e diversas variantes do ASIC também foram descobertas. Os ASICs são trímeros de proteínas e podem ser compostos de diferentes combinações de subunidades. Após a descoberta e clonagem, os ASICs tornaram-se os principais candidatos a sensor de prótons extracelulares (FEIN, 2011).

Esses canais de cátions ativados por prótons extracelulares são insensíveis à voltagem, expressos em neurônios sensoriais e predominantemente localizados em neurônios de pequeno diâmetro, sendo distribuídos de forma generalizada no cérebro (WALDMANN; LAZDUNSKI, 1998).

A acidose tecidual está relacionada com a dor persistente. Alguns estudos demonstraram que a expressão de ASICs é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como fator de crescimento neural (NGF), serotonina, interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (VOILLEY *et al.*, 2001; MAMET *et al.*, 2002).

### **1.1.2.2 Mediadores químicos e nocicepção**

Os mediadores químicos estimulam os nociceptores quimiosensíveis e agem através de dois mecanismos, ou seja, excitação ou sensibilização. Somente alguns mediadores agem via excitação, sendo a grande maioria dos mediadores substâncias que provocam uma diminuição no limiar de despolarização dos nociceptores, tornando-os responsivos a estímulos de baixa intensidade (COUTAUX *et al.*, 2005).

Os nociceptores presentes no tecido lesado podem ser ativados e sensibilizados tanto por substâncias liberadas no local do foco inflamatório como através do recrutamento de fibras adjacentes. Essa rede de interações neuroquímicas constitui a base da hiperalgesia (COUTAUX *et al.*, 2005).

Os principais mediadores inflamatórios que participam no processo nociceptivo, assim como características importantes dos mesmos encontram-se relacionados no **quadro 1**.

**Quadro 1. Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.**

<b>MEDIADOR</b>	<b>EFEITO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
Óxido Nítrico (NO)	Sensibilização do nociceptor	Analgesia ou hiperalgesia, dependendo da concentração	OKUDA <i>et al</i> , 2001 DOURSOUT <i>et al</i> , 2003 SOUSA; PRADO, 2001
Bradicinina (BK)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia mediada por receptores B1 e B2, sensibilização de receptores TRPV1, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor neuropática	DRAY, 1997 STERANKA <i>et al</i> , 1988 LOPES <i>et al</i> , 1995 NI <i>et al</i> , 1998 DRAY; PERKINS, 1993 AUNSTIN <i>et al</i> , 1997 FERREIRA <i>et al</i> , 1993 MATHIS <i>et al</i> , 1996 ANDREVA; RANG, 1993
Substância P (SP)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato	TEOH <i>et al</i> , 1996 CARLTON <i>et al</i> , 1998 LOFGREN <i>et al</i> , 1999 FURST, 1999 TURNBACH; RANDICH, 2002
Prostaglandinas (PGS)	Sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em modelos de dor inflamatória e neuropatia sensível aos inibidores da ciclooxigenase	MALMBERG; YAKSH, 1995 BEICHE <i>et al</i> , 1996 YANG <i>et al</i> , 1996 TOTANI <i>et al</i> , 2001 SYRIATOWICZ <i>et al</i> , 1999
Citocinas pró inflamatórias e TNF- $\alpha$	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica	STEIN <i>et al</i> , 1988 CUNHA <i>et al.</i> , 1991 GEORGE <i>et al</i> , 2005 MURPHY <i>et al</i> , 1999 FUKUOKA <i>et al</i> , 1994
Serotonina (5-HT)	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperalgesia em humanos através da excitação das fibras C e A $\delta$ , (principalmente pela ligação em 5-HT <sub>3</sub> )	JULIUS <i>et al</i> , 2001 MILAN, 1999
Fator de Crescimento Neural (NGF)	Sensibilização do nociceptor	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	MARCHAND <i>et al</i> , 2005

Fonte: CARVALHO, 2011.

## 1.2 PARTE II

### 1.2.1 A importância dos produtos naturais na síntese de novas moléculas.

O tratamento e a cura de muitas doenças através da utilização de plantas vêm sendo feita ao longo da história. Ainda hoje, em regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas (MACIEL, 2002).

Os produtos naturais podem ser considerados como uma população de estruturas selecionadas através de pressões evolucionistas para interagir com uma grande variedade de proteínas e outros alvos biológicos para propósitos específicos; esse ponto de vista é reiterado pelo fato de que os produtos naturais têm sido reconhecidos como drogas efetivas para uma grande variedade de indicações terapêuticas (KOEHN; CARTER, 2005).

Embora amplamente utilizadas na medicina popular em muitos países, muitas das plantas medicinais têm seus princípios ativos desconhecidos, sendo necessários estudos experimentais que visem demonstrar suas propriedades farmacológicas (SOSA *et al.*, 2002).

Os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade mundial; somente o Brasil representa 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos. Apesar da grande variedade de recursos naturais, esses países ainda não os utilizam de maneira adequada, em benefício do seu próprio desenvolvimento (CALIXTO, 2005).

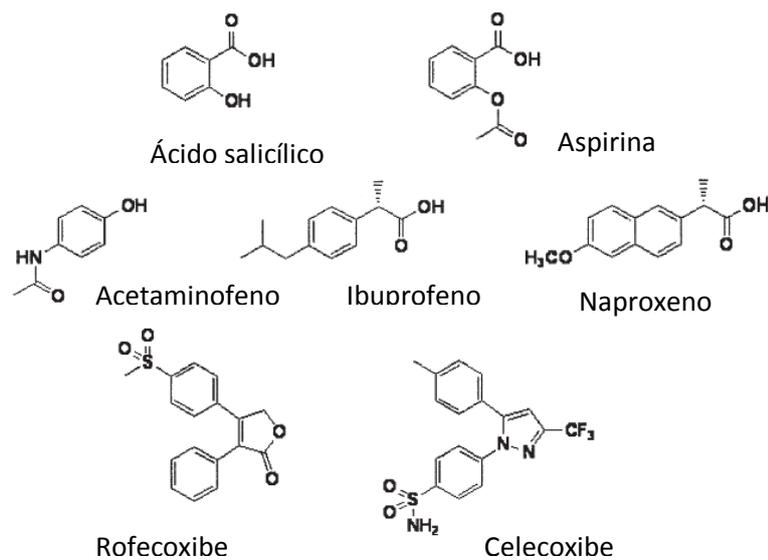
O uso de produtos naturais como fonte de inspiração aliado ao uso dos instrumentos da Química Medicinal é ainda uma estratégia bastante útil na prospecção de novas moléculas bioativas devido a sua alta diversidade química, especificidade bioquímica, vasta capacidade de biossíntese e outras características que as tornam favoráveis para a descoberta de novas drogas (SCHMIDT *et al.*, 2008; KOEHN; CARTER, 2005).

Um dos marcos no que concerne ao desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais foi a descoberta dos salicilatos obtidos através de folhas de *Salix Alba*. Através de estudos realizados no Instituto de Farmacologia de Munique, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade do princípio ativo salicina no ano de 1828. Em 1860 foi descoberto o ácido salicílico por Hermann Kolbe e seus alunos, o qual começou a ser produzido em larga escala e amplamente comercializado posteriormente. Somente em 1898, Felix Hofmann

conseguiu isolar o ácido acetilsalicílico, que foi registrado em 1899 como “aspirina” (JACK, 1997; RISHTON, 2008).

O isolamento do ácido acetilsalicílico pode ser considerado não apenas como a descoberta de um novo medicamento, porém como o estopim do desenvolvimento de uma área terapêutica inteira, visto que vários outros medicamentos foram desenvolvidos através de modificações na estrutura do ácido acetilsalicílico em busca de medicamento com efeito terapêutico semelhante, ou melhor, com efeitos colaterais menos pronunciados. (JACK, 1997; RISHTON, 2008). (Figura 2)

**Figura 2. Evolução do ácido salicílico natural para a aspirina sintética e o subsequente desenvolvimento de várias drogas antiinflamatórias não-esteroidais e de inibidores da ciclooxigenase-2**



Fonte: RISHTON, 2008.

Dos 847 fármacos de baixo peso molecular (micromoléculas) lançados no mercado entre 1981 e 2006, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por hemi-síntese a partir de produtos naturais e 572 obtidos por síntese total. Entretanto, 262 entre estas últimas substâncias possuíam um grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais ou poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Ao invés de considerar os produtos naturais como distintos da síntese combinatória, torna-se mais efetivo adotar estratégias que combinem ambas as abordagens. Há muitas estratégias através das quais a diversidade molecular única dos produtos naturais pode ser aproveitada no projeto de coleções de síntese combinatória. Visa-se a elaboração de modificações estruturais do esqueleto de um produto natural bioativo já existente de maneira sistemática, a fim de promover melhoras na sua atividade biológica inerente ou nas suas propriedades, enquanto droga. Isso pode ser realizado através das modificações semi-sintéticas da molécula ou de métodos sintéticos (KOEHN; CARTER, 2005).

Apesar do desafio dos pesquisadores para desenvolver a síntese de novos compostos baseados em produtos naturais de maneira rápida e em grande escala, a gama de pesquisas científicas que estão sendo desenvolvidas, juntamente com a grande quantidade de moléculas naturais selecionadas através da evolução seriam capazes de assegurar os produtos naturais como fonte de futuros agentes terapêuticos. Além disso, o isolamento contínuo de uma série de novos metabólitos secundários bioativos sugere que foram descobertas apenas uma pequena parte da vasta coleção de ligantes de pequenas moléculas naturais, podendo constituir um recurso para além da capacidade da química sintética corrente por um longo tempo (SCHMIDT *et al.*, 2008; PATERSON; ANDERSON, 2005).

### **1.2.2 *Aniba riparia* e as Riparinas**

O gênero *Aniba* é composto por aproximadamente 41 espécies que encontram-se distribuídas na América Central, Antilhas e América do Sul, sendo a região das Guianas e a Amazônia Central os locais de maior concentração do número de espécies. No Brasil, o gênero é representado por cerca de 25 espécies, dentre elas a *Aniba riparia* (Ness) Mez (QUINET; ANDREATA, 2002).

A espécie *Aniba riparia* (Ness) Mez é típica da região amazônica, e é popularmente conhecida como louro amarelo (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1988). Nas cascas do seu caule foi descoberta a presença de flavonóides, benzoatos e benzaldeídos (FRANÇA *et al.*, 1976); já no seu fruto verde foi demonstrada a presença de neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e alguns alcalóides, especificamente alcanidas (feniletilamidas do ácido benzóico). Dentre esses compostos, a classe das alcanidas tem sido fonte de interesse de pesquisadores na busca de novas fontes vegetais com princípios farmacologicamente ativos

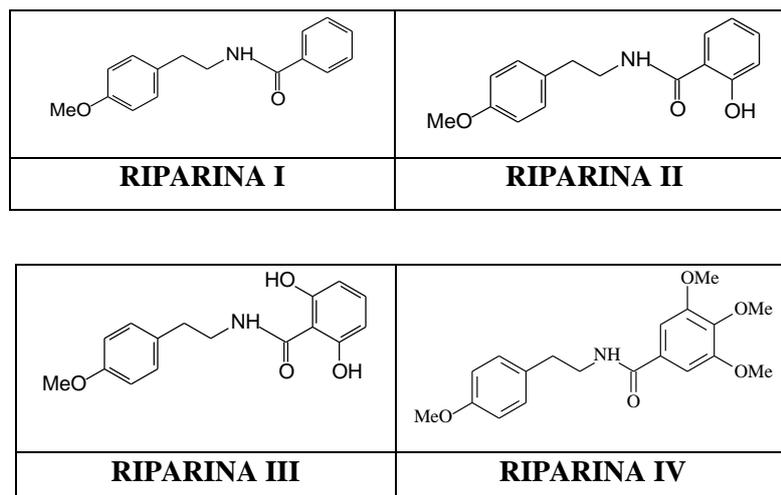
(FERNANDES; GOTTHEB; XAVIER, 1978; FRANÇA *et al.*, 1976; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; CASTELO-BRANCO, 2000).

Éteres metílicos de N-benzoiltiramina (riparina I), de N-(2-hidroxibenzoil) -tiramina (riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III), isoladas dos frutos de *Aniba riparia* (Ness) Mez, apresentam diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antimalárica, schistossomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992). Essas alcaloides foram denominadas riparinas em homenagem à planta (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997).

As riparinas I, II e III foram submetidas a ensaios experimentais, que demonstraram ausência de toxicidade aguda e de alterações centrais, autonômicas ou musculares, demonstrando assim serem viáveis para uso enquanto princípios ativos para fármacos (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000). As três substâncias apresentaram efeito hipotensor e bradicárdico transitório devido a uma ação que parece envolver principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

A Riparina IV é uma substância sintética, que possui o mesmo grupo (núcleo) das riparinas isoladas da planta *Aniba riparia*, e possui essa denominação por tratar-se de um análogo das riparinas. (Figura 3)

**Figura 3. Estrutura química das Riparinas I,II,III e IV**



Fonte: CASTELO-BRANCO, 1992.

### 1.3 Relevância e Justificativa

Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, a atividade antinociceptiva de algumas riparinas foi testada. A Riparina I demonstrou esta atividade em modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos, sendo sugeridos mecanismos de ação periféricos e centrais do composto (ARAÚJO *et al.*, 2009). Já a Riparina II apresentou uma ação antinociceptiva de ação apenas periférica, interagindo com receptores TRPV1 e NMDA (CARVALHO, 2011).

Devido à comprovada atividade antinociceptiva das riparinas I e II, e sendo a Riparina IV um análogo estrutural dessas substâncias, torna-se relevante a investigação do seu potencial farmacológico em modelos clássicos de nocicepção.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o potencial antinociceptivo da Riparina IV em camundongos, e os possíveis mecanismos envolvidos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o efeito antinociceptivo da Riparina IV nos modelos animais de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente, formalina e teste da hipernocicepção mecânica induzida por carragenina;
- Pesquisar o envolvimento de receptores de glutamato na ação antinociceptiva da Riparina IV;
- Analisar a participação dos receptores de potencial transitório (TRP) no efeito antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído e mentol;
- Investigar o papel dos canais de potássio dependentes de ATP, dos sistemas  $\alpha$ 2-adrenérgico e serotoninérgico, e do Oxido Nítrico no mecanismo de ação antinociceptivo da Riparina IV através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Avaliar se a Riparina IV compromete a atividade motora dos animais nos modelos de campo aberto e rota Rod;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção do material

As feniletilaminas, p-hidroxifeniletilaminas, e seus derivados, são encontrados em abundância na natureza. Porém, aminas derivadas de ácidos benzóicos substituídos são relativamente raras. A descoberta da atividade antibacteriana das amidas isoladas de *Aniba riparia* levaram à síntese de vários análogos dessas amidas para o estudo de suas características biológicas e espectrais.

Como os compostos ativos isolados a partir *Aniba riparia* são conjugados de o-metiltiramina e ácidos benzóicos substituídos, foram sintetizados vários análogos destes, mantendo a porção amina constante com variações no padrão de substituição da porção de ácido benzóico.

A substância utilizada no presente estudo foi cedida pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho do grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

#### 3.2 Drogas e reagentes

- Ácido Acético Glacial P.A. (Vetec®, Brasil)
- Água Destilada (Deionizador)
- Formaldeído P.A. (Reagen®, Brasil)
- Tween 80- Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate (Vetec®, Brasil)
- L-arginina (Sigma®, U.S.A.)
- Capsaicina (Sigma®, U.S.A.)
- MK-801 (Sigma®, U.S.A.)
- pCPA (Sigma®, U.S.A.)
- Glibenclâmida (Sigma®, U.S.A.)
- Cinamaldeído (Sigma®, U.S.A.)
- Cânfora (Sigma®, U.S.A.)
- Mentol (Sigma®, U.S.A.)
- Carragenina (Sigma®, U.S.A.)
- Glutamato (Sigma®, U.S.A.)

- Sulfato de Morfina (Cristália®, Brasil)
- Indometacina (Sigma®, U.S.A)
- Vermelho de Rutênio (Sigma®, U.S.A)
- Ioimbina (Sigma®, U.S.A.)

### 3.3 Equipamentos e materiais

- Balança Analítica (Modelo H5, Mettler®, Suíça)
- Balança para animais (Filizola®, Brasil)
- Cronômetros (Incoterm®, Brasil)
- Analgesímetro Digital (Insight®, Brasil)
- Placa Quente (mod. DS37) (Ugo Basile®, Itália)
- Equipamento do Rota Rod (Ugo Basile®, Italy)
- Campo aberto (Confeccionado)
- Seringas Plásticas (BD® Plastipak)
- Alicates para deslocamento cervical
- Pipetas automáticas (H.E., Dinamarca)

### 3.4 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 e 35 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em caixas de prolipopileno a temperatura média de  $26 \pm 2^\circ$  C e ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 6-8 horas, antes da realização dos experimentos em que a via oral era utilizada.

Todos os protocolos envolvendo a utilização de animais realizados nesse trabalho seguiram as recomendações do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), respeitando a legislação vigente e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 38/2011).

### **3.5 Testes de atividade antinociceptiva**

#### **3.5.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Os animais foram divididos em 4 grupos e tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Indometacina (10 mg/kg, dissolvida em bicarbonato de sódio 8,4%) foi utilizada como droga de referência. Todos os tratamentos foram realizados por via oral (v.o.). Após 60 minutos, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% (10 mL/kg). Decorridos 10 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado durante um período de 20 minutos. Uma contorção foi padronizada como uma extensão das patas traseiras, acompanhada da constrição do abdômen (KOSTER; ANDERSON; DE BEER, 1959).

#### **3.5.2 Teste da placa quente**

Os animais foram divididos em 4 grupos e pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a uma temperatura de  $51 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Aqueles que mostraram tempo de reação superior a 20 segundos foram descartados. Os camundongos selecionados foram colocados na placa quente e tiveram o tempo de reação (ato de saltar ou lambem a pata traseira) registrado antes e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de Riparina IV nas doses de 25 e 50mg/kg, morfina (7,5 mg/Kg) ou veículo (3% de Tween 80 em água destilada). Estes tratamentos foram realizados por via oral, com exceção da morfina, cujo tratamento foi realizado por via intraperitoneal. (EDDY; LEIMBACH, 1953).

#### **3.5.3 Teste da formalina**

Os animais foram divididos em 4 grupos, foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Morfina (7,5 mg/kg, i.p.) foi utilizada como droga de referência. Todos os tratamentos, com exceção da morfina, foram realizados por via oral. Após 30 (i.p.) ou 60 minutos (v.o.) em relação a estes tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 1% na pata direita traseira (20  $\mu\text{L}$ ). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1<sup>a</sup> Fase) e 20-25 min (2<sup>a</sup> Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

### **3.5.4 Teste de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina**

As respostas comportamentais para o estímulo mecânico foram realizadas com o auxílio do filamento de Von Frey (diâmetro de 0,8 mm), e foram mensuradas antes, e após 30, 60 e 180 minutos do tratamento. Os camundongos foram colocados em uma caixa elevada com uma trama de arame no soalho. Os filamentos de Von Frey foram aplicados embaixo da superfície plantar da pata direita traseira em ordem ascendente de estímulo de força até um valor máximo de 50 g (para evitar lesão na pata). No limiar, o camundongo retirava a pata do filamento. A pata direita traseira foi testada três vezes, sendo o intervalo entre dois testes consecutivos na mesma pata de até 1 minuto. Os resultados foram apresentados como a média das respostas contra um dado estímulo de força. A hipernocicepção foi mensurada como sendo a diferença entre a leitura do tempo zero e dos tempos mensurados (30, 60 e 180 minutos). Após a administração intraplantar de carragenina 0,1% por pata em camundongos pré-tratados com Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg ou veículo (3% de Tween 80 em água destilada) 60 minutos antes da administração desse agente flogístico. (ROCHA *et al*, 2011).

### **3.5.5 Participação dos receptores glutamatérgicos**

#### **3.5.5.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato**

Os animais foram tratados com Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg ou veículo (3% de Tween 80 em água destilada) . Após 60 min, os animais receberam, por via intraplantar, 20 µl de solução de glutamato (20 µmol/pata), preparada em solução salina com pH ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio na pata posterior direita. A resposta nociceptiva (tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada) foi cronometrada por um período de 15 min (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

### **3.5.6 Participação dos receptores de potencial transitório (TRP)**

#### **3.5.6.1 Teste da nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina**

Com o objetivo de avaliar o possível envolvimento dos receptores TRPV1, foi realizado o experimento de nociceção induzida pela injeção de capsaicina (agonista de receptor TRPV1).

Os animais foram divididos em 4 grupos e tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Vermelho de rutênio (antagonista TRP não-seletivo; 3 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga de referência. Todos os tratamentos, com exceção do vermelho de rutênio, foram realizados por via oral. Após 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl da solução de capsaicina (2.2µg/pata) na pata direita traseira. O tempo de lambadura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min, e considerado como um índice de nociceção. (SANTOS; CALIXTO, 1997).

#### **3.5.6.2 Teste da nociceção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído**

Para investigar o possível papel dos receptores TRPA1 no efeito antinociceptivo da Riparina IV, foi realizado o experimento de nociceção induzida pela injeção de cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1).

Os animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada) ou Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Cânfora (antagonista TRPA1; 7,6 mg/kg, s.c.). Todos os tratamentos, com exceção da cânfora, foram realizados por via oral. Após 15 (s.c.) ou 60 (v.o.) minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl da solução de cinamaldeído (10 nmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como índice de nociceção (ANDRADE *et al.*, 2008).

### **3.5.6.3 Teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol**

Com o objetivo de avaliar a possível relação dos receptores TRPM8 na ação antinociceptiva da Riparina IV, foi realizado o experimento de nocicepção induzida pela injeção de mentol (agonista de receptor TRPM8).

Os animais foram tratados com veículo (3% Tween 80 em água destilada), Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg ou vermelho de rutênio (antagonista TRP não-seletivo; 3 mg/kg, i.p.). Todos os tratamentos, com exceção da cânfora, foram realizados por via oral. Após 30 (i.p.) ou 60 (v.o.) minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl da solução de mentol (1,2 µmol/pata) na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado por um período de 20 min e considerado como índice de nocicepção (ANDRADE *et al.*, 2008).

### **3.5.7 Estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos**

#### **3.5.7.1 Participação dos canais de potássio dependentes de ATP**

O papel dos canais de potássio dependentes de ATP sobre o possível efeito antinociceptivo da riparina IV foi determinado pela administração de Glibenclamida (2,0 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes de os animais receberem Riparina IV na dose de 50 mg/kg, v.o., ou veículo (3% de Tween 80 em água destilada). Após 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

#### **3.5.7.2 Participação dos receptores serotoninérgicos**

Os animais foram tratados durante 4 dias consecutivos com pCPA (100 mg/kg i.p.), a fim de depletar as reservas de serotonina do animal. No 4º dia, 30 minutos após o tratamento com pCPA, os animais receberam Riparina IV na dose de 50 mg/kg, v.o., veículo (3% de Tween 80 em água destilada). Após 30 minutos desse último tratamento, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

### **3.5.7.3 Participação dos receptores $\alpha$ 2-adrenérgicos**

O papel dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos sobre o possível efeito antinociceptivo da Riparina IV foi determinado pela administração de Ioimbina (2,5 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes de os animais receberem Riparina IV na dose de 50 mg/kg, v.o., ou veículo (3% de Tween 80 em água destilada). Após 30 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

### **3.5.7.4 Participação do óxido nítrico**

O papel do NO sobre o possível efeito antinociceptivo da Riparina IV foi determinado pela administração de L-arginina (150 mg/kg; i.p.). Os animais receberam L-arginina e foram submetidos ao teste após 30 minutos. Um outro grupo de animais recebeu riparina IV na dose que apresentou melhor efeito analgésico (50 mg/kg, v.o.) e após 30min receberam L-arginina (150 mg/kg; i.p.). Após 30 minutos do tratamento os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.

## **3.6 Testes de atividade locomotora**

### **3.6.1 Teste do campo aberto**

O aparato para camundongos é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30x30x15 cm) e dividido em 9 quadrantes. Foi realizado tratamento dos animais, por via oral, com veículo (2% de Tween 80 em água destilada), Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Diazepam (2 mg/kg) foi utilizado como droga de referência. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados, um por vez, no centro do campo aberto, e foram observados o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea: ALE) durante 5 minutos. (CRUZ *et al.*, 1997)

### **3.6.2 Avaliação da capacidade locomotora na barra giratória (rota Rod)**

Esse experimento foi realizado para excluir a possibilidade dos parâmetros observados nos experimentos que avaliaram a atividade antinociceptiva terem sido influenciados por alterações na coordenação motora dos animais.

Para esse teste, os camundongos receberam tratamento com veículo (3% de Tween 80 em água destilada), Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg. Diazepam (2 mg/kg) foi utilizado como padrão positivo. Todos os tratamentos, com exceção do diazepam, foram realizados por via oral. Após 30 ou 60 minutos do tratamento, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM; MIYA, 1957).

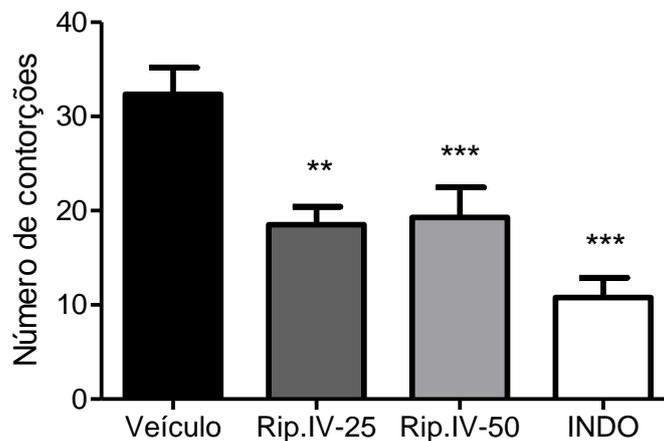
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade antinociceptiva

#### 4.1.1 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de contorções abdominais induzidas por Ácido Acético.

A administração oral de Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético [Rip.IV-25:  $18,50 \pm 1,927$ ,  $p < 0,01$ ; Rip.IV-50:  $18,83 \pm 2,931$ ,  $p < 0,001$ ], em relação ao veículo [ $32,36 \pm 2,814$ ]. O grupo de animais pré-tratados com indometacina 10 mg/kg, v.o., um anti-inflamatório não esteróide usado como droga de referência, promoveu uma redução significativa do número de contorções abdominais [INDO:  $10,78 \pm 2,107$ ,  $p < 0,001$ ]. Os resultados são mostrados na **Figura 4**.

**Figura 4. Efeito da administração oral de Riparina IV e indometacina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.**



Riparina IV (25 e 50 mg/kg), Veículo (3% de Tween em água destilada) e Indometacina foram administrados 60 min. antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. Foram utilizados de 8 a 14 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo. (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

#### 4.1.2 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nocicepção térmica na placa quente.

A Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg não modificou o tempo de reação a placa quente ( $51 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) em nenhum dos intervalos de tempo pré estabelecidos quando comparado ao veículo (**Tabela 2**), diferente da morfina (7,5 mg/kg), usada como droga de referência que promoveu um aumento significativo no tempo de reação em todos os tempos observados em relação ao grupo tratado apenas com o veículo.

**Tabela 2. Efeito da Riparina IV sobre o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico da placa quente.**

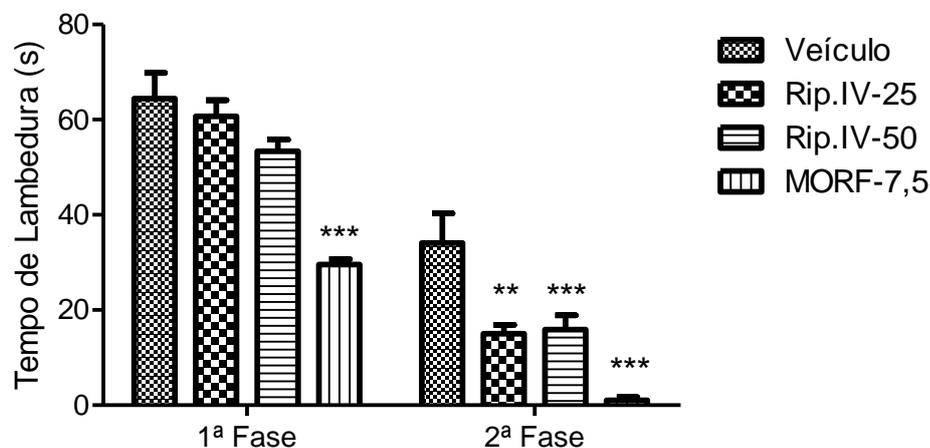
Grupo	Tempo de Resposta ao estímulo				
	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Veículo	15,17 $\pm$ 1,835	11,64 $\pm$ 1,260	11,58 $\pm$ 2,074	10,77 $\pm$ 2,610	16,63 $\pm$ 2,376
Rip.IV-25	15,03 $\pm$ 2,209	17,43 $\pm$ 2,658	17,63 $\pm$ 1,699	15,57 $\pm$ 1,693	15,05 $\pm$ 4,075
Rip.IV-50	17,56 $\pm$ 1,927	15,94 $\pm$ 3,140	14,47 $\pm$ 2,820	16,30 $\pm$ 1,781	13,56 $\pm$ 3,418
MORF-7,5	20,88 $\pm$ 1,340	28,60 $\pm$ 0,9904 ***	24,96 $\pm$ 1,568 ***	25,21 $\pm$ 1,993 ***	28,04 $\pm$ 1,014 **

Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de reação ao estímulo térmico. A resposta consiste em saltar ou lambar a pata direita traseira após serem colocados na placa quente. O tempo de reação dos animais a placa quente foi avaliado antes e 30, 60, 90 e 120 min. após os tratamentos. Foram utilizados 9 animais por grupo. \*\*\*p < 0,001, \*\* p < 0,001 vs Veículo (ANOVA e Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.3 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nociceção induzida pela formalina.

A **Figura 5** mostra que a administração oral de Riparina IV nas doses de 25 mg/kg [60,7 ± 3,416] e 50 mg/kg [53,36 ± 2,491], não foi capaz de reduzir o comportamento do animal de lambe a pata injetada com formalina durante a primeira fase do teste (0 - 5 minutos) em relação ao veículo [64,44 ± 5,406]. Em relação à segunda fase do teste (20 - 25 minutos), a Riparina IV nas doses de 25 mg/kg [Rip.IV-25: 15 ± 1,921,  $p < 0,01$ ] e 50 mg/kg [Rip.IV-50: 15,91 ± 2,977,  $p < 0,001$ ] foi capaz de promover uma redução significativa do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata em relação ao veículo [34,11 ± 6,188]. A morfina (7,5 mg/kg; i.p.), um analgésico opióide, foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambedura da pata tanto na primeira como na segunda fase do teste [MORF 7,5:1ª fase: 29,57 ± 1,152,  $p < 0,001$ ; 2ª fase: 1,000 ± 0,7237,  $p < 0,001$ ].

**Figura 5.** Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambedura da pata no modelo de nociceção induzida pela formalina, na primeira (0-5 minutos) e segunda fase (20-25 minutos) no teste da nociceção induzida pela formalina.

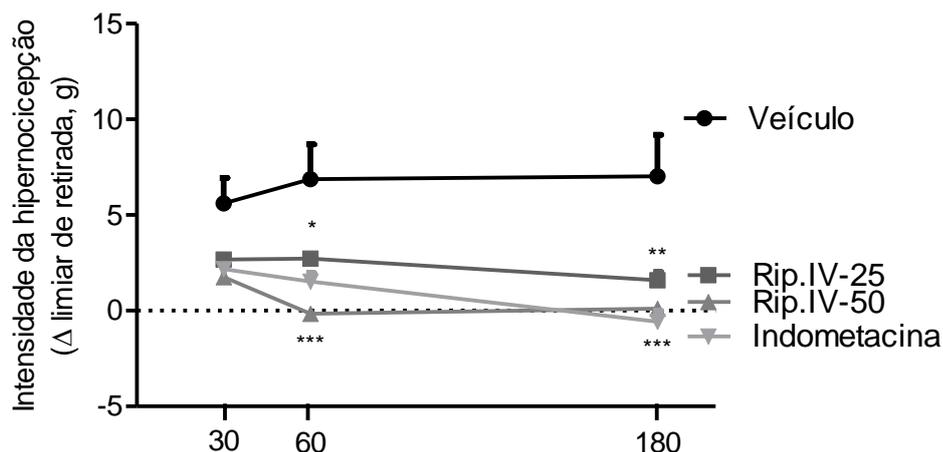


Riparina IV (25 e 50 mg/kg) e Veículo (3% de Tween em água destilada) foram administrados 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 1%. Um grupo recebeu Morfina (7,5 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de formalina 1%. Os valores no gráfico representam a média ± E.P.M. do tempo de lambedura da pata após a aplicação da formalina na pata direita traseira. Foram utilizados de 7 a 13 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA e Student Newman Keuls, *post hoc*).

#### 4.1.4 Avaliação do potencial antinociceptivo da Riparina IV no modelo de hipernociceção mecânica induzida pela carragenina

Na **Figura 6** observa-se que a injeção de carragenina na região subplantar da pata dos camundongos induziu uma hipernociceção mecânica caracterizada por um aumento na sensibilidade. A sensibilidade foi mantida de 30 a 180 minutos após a administração da carragenina. Os animais tratados com indometacina (10 mg/kg, i.p.) exibiram uma redução significativa na hipernociceção mecânica induzida pela carragenina em todos os tempos avaliados [Indometacina:  $2,182 \pm 0,357$ ,  $p < 0,05$ ;  $1,520 \pm 0,457$ ,  $p < 0,01$ ;  $-0,580 \pm 0,578$ ,  $p < 0,001$ ], quando comparados aos animais tratados com veículo [Veículo:  $5,600 \pm 1,345$ ;  $6,867 \pm 1,821$ ;  $7,029 \pm 2,160$ ]. A Riparina IV na dose de 25 mg/kg demonstrou um efeito anti-nociceptivo semelhante ao da indometacina nos tempos de 60 e 180 minutos [Rip IV-25:  $2,667 \pm 0,209$   $p < 0,05$ ;  $2,719 \pm 0,355$   $p < 0,05$ ;  $1,586 \pm 0,439$   $p < 0,01$ ]; a Riparina IV na dose de 50 mg/kg demonstrou um efeito anti-nociceptivo semelhante ao da indometacina em todos os tempos [Rip IV-50:  $1,767 \pm 0,563$ ,  $p < 0,05$ ;  $-0,167 \pm 0,372$ ,  $p < 0,001$ ;  $0,105 \pm 0,393$ ,  $p < 0,001$ ].

**Figura 6.** Efeito da administração do veículo, Riparina IV ou indometacina na hipernociceção mecânica induzida por carragenina.

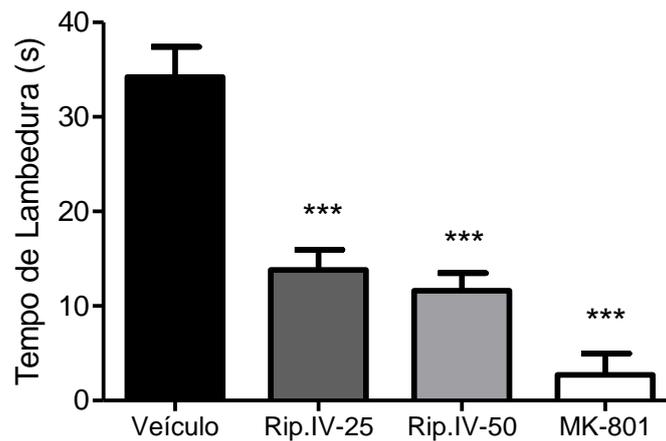


Riparina IV (25 e 50 mg/kg), Veículo (3% de Tween em água destilada) e Indometacina (10mg/kg) foram administrados 60 minutos antes, e indometacina 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina a 0,1%. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar de retirada da pata (em gramas) da estimulação tátil da pata direita traseira. Foram utilizados de 6 a 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (Two way ANOVA e Bonferroni test, *post hoc*).

#### 4.1.5 Avaliação da participação dos receptores glutamatérgicos na ação antinociceptiva da Riparina IV

Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, reduziu de forma significativa ( $p < 0,001$ ) o tempo de lambertura da pata, após a administração intraplantar de glutamato [Rip.IV-25:  $13,82 \pm 2,148$ ; Rip.IV-50:  $11,63 \pm 1,861$ ] ao em relação ao veículo [ $34,23 \pm 3,189$ ]. O MK-801 (7,6 mg/kg, *s.c.*), utilizado como droga de referência, reduziu significativamente [MK-801:  $2,714 \pm 2,254$ ] o tempo de lambertura da pata quando comparado ao veículo. (Figura 7)

**Figura 7. Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambertura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pelo glutamato.**



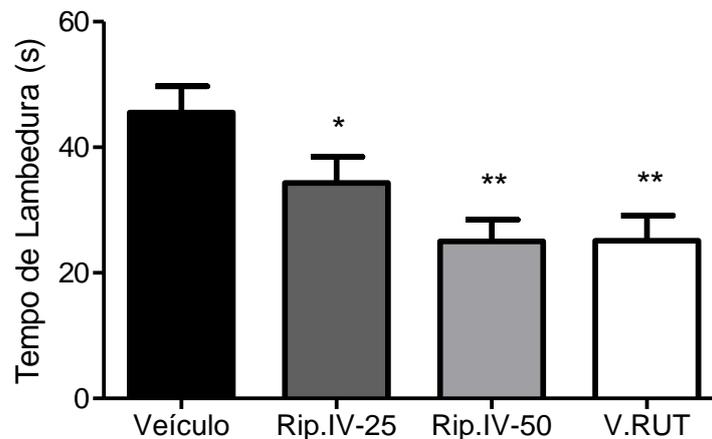
Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (25 e 50 mg/kg), MK-801 foram administrados 60 minutos antes do glutamato. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambertura da pata (s), durante 15 minutos. Foram utilizados de 7 a 13 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*)

#### 4.1.6 Participação dos receptores de potencial transitório (TRP)

##### 4.1.6.1 Avaliação da participação dos receptores TRPV1 na ação antinociceptiva da Riparina IV

Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, reduziu de forma significativa o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração intraplantar de capsaicina [Rip.IV-25:  $34,33 \pm 4,123$ ;  $p < 0,05$ ; Rip.IV-50:  $25,00 \pm 3,480$ ;  $p < 0,01$ ] em relação ao Veículo [ $45,55 \pm 4,190$ ]. O vermelho de rutênio (3 mg/kg), utilizado como droga de referência, reduziu significativamente [V.RUT.:  $25,13 \pm 4,020$ ;  $p < 0,01$ ] o tempo de lambedura da pata quando comparado ao controle. **Figura 8**

**Figura 8.** Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambedura da pata no modelo de nocicepção induzida pela capsaicina.

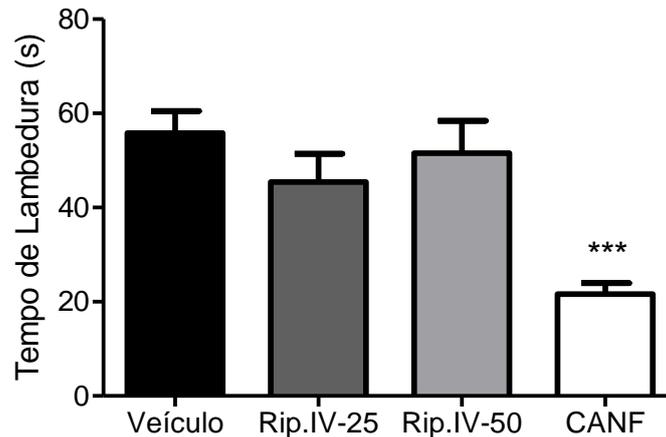


Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (25 e 50 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes, e vermelho de rutênio 30 minutos antes da capsaicina. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo que o animal gastou lambendo a pata em segundos (s), durante 5 minutos. Foram utilizados de 8 a 11 animais por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).

#### 4.1.6.2 Avaliação da participação dos receptores TRPA1 na ação antinociceptiva da Riparina IV

Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, não foi capaz de reduzir de forma significativa o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração intraplantar de cinamaldeído [Rip.IV-25:  $45,43 \pm 5,988$ ; Rip.IV-50:  $51,57 \pm 6,838$ ] em relação ao Veículo [ $55,83 \pm 4,689$ ]. A cânfora (7,6 mg/kg, *s.c.*), utilizada como droga de referência, reduziu significativamente [CANF:  $21,60 \pm 2,353$ ] o tempo de lambedura da pata quando comparado ao veículo. (Figura 9)

**Figura 9.** Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pelo cinamaldeído.

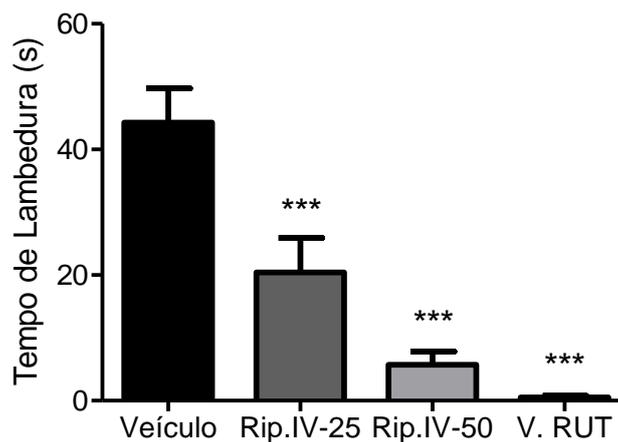


Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (25 e 50 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes, e a cânfora 15 minutos antes do cinamaldeído. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo que o animal gastou lambendo a pata em segundos (s), durante 5 minutos. Foram utilizados de 7 a 12 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).

#### 4.1.6.3 Avaliação da participação dos receptores TRPM8 na ação antinociceptiva da Riparina IV

Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral, foram capazes de reduzir de forma significativa o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração intraplantar de mentol [Rip.IV-25:  $20,43 \pm 5,511$ ; Rip.IV-50:  $5,714 \pm 2,101$ ;  $p < 0,001$ ] em relação ao Veículo [ $44,30 \pm 5,412$ ]. O vermelho de rutênio (3 mg/kg), utilizado como droga de referência, reduziu significativamente [V.RUT.:  $0,5 \pm 0,2673$ ;  $p < 0,001$ ] o tempo de lambedura da pata quando comparado ao controle. (**Figura 10**)

**Figura 10.** Efeito da Riparina IV sobre o tempo de lambedura da pata direita traseira no modelo de nociceção induzida pelo mentol.



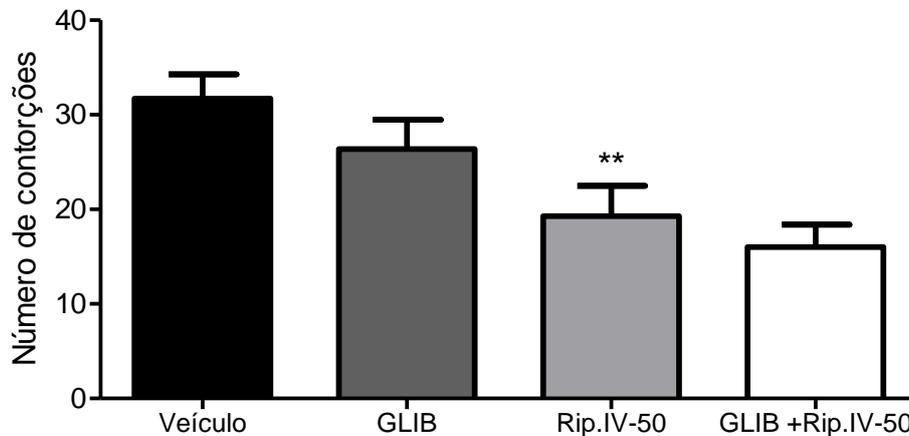
Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (25 e 50 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes do mentol. Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. do tempo que o animal gastou lambendo a pata em segundos (s), durante 5 minutos. Foram utilizados de 7 a 10 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).

#### 4.1.7 Investigação dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da Riparina IV

##### 4.1.7.1 Investigação do envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP no efeito antinociceptivo da Riparina IV

O tratamento com a glibenclamida sozinha, (2 mg/kg) i.p., não foi capaz de diminuir significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético [GLIB:  $26,40 \pm 3,092$ ;  $p > 0,05$ ]. O pré-tratamento com glibenclamida, não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva da Riparina IV na dose de 50 mg/kg [GLIB + Rip.IV-50:  $16,00 \pm 2,380$ ], quando comparada com a Riparina IV administrada sozinha [Rip.IV-50:  $19,27 \pm 3,211$ ]. (Figura 11)

**Figura 11. Efeito da Riparina IV (50 mg/kg) v.o. , sozinha ou associada com Glibenclamida (2 mg/kg) i.p., sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.**

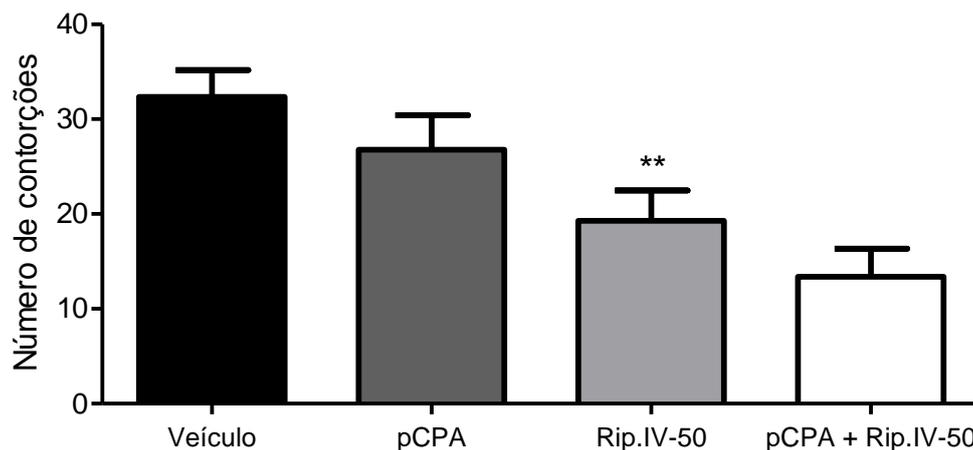


Veículo (3% de Tween em água destilada) e Riparina IV (Rip.IV-50 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 15 min após a administração de Glibenclamida (GLIB; 2 mg/kg) e, então, 30 min. depois foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. Foram utilizados de 7 a 17 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  vs Veículo (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

#### 4.1.7.2 Investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito antinociceptivo da Riparina IV

O tratamento com pCPA sozinho (100 mg/kg) i.p., não foi capaz de diminuir significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético [pCPA:  $26,78 \pm 3,643$ ]. O pré-tratamento com pCPA (100 mg/kg) i.p., não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva da Riparina IV na dose de 50 mg/kg [pCPA + Rip.IV-50:  $13,38 \pm 2,964$ ], quando comparada com a Riparina IV administrada sozinha [Rip.IV-50:  $19,27 \pm 3,211$ ]. (Figura 12)

**Figura 12. Efeito da Riparina IV (50 mg/kg) v.o. , sozinha ou associados com pCPA (100 mg/kg) i.p., sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.**

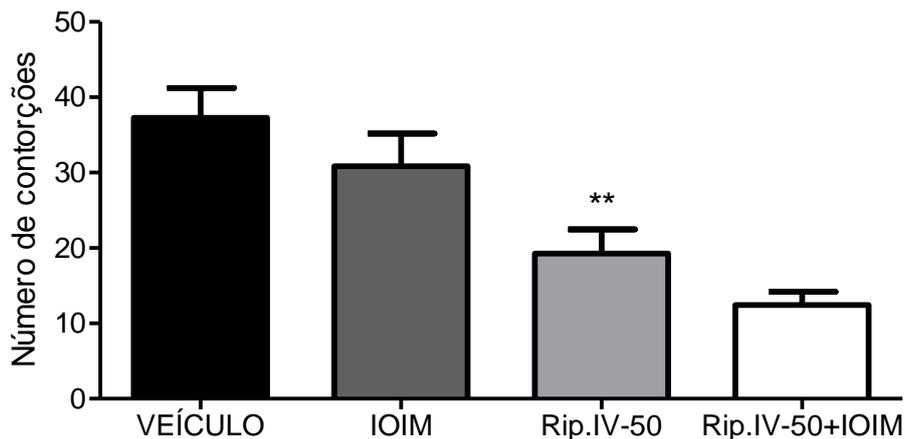


Veículo (3% de Tween em água destilada) e Riparina IV (Rip.IV; 50 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de pCPA (pCPA; 100 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. Foram utilizados de 9 a 14 animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$  vs Veículo (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

#### 4.1.7.3 Investigação do envolvimento dos receptores $\alpha$ 2-adrenérgicos no efeito antinociceptivo da Riparina IV

O tratamento com ioimbina sozinha (2,5 mg/kg) i.p., não foi capaz de diminuir significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético [IOIM:  $30,86 \pm 4,312$ ]. O pré-tratamento com ioimbina (2,5 mg/kg) i.p., não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva da Riparina IV na dose de 50 mg/kg [IOIM + Rip.IV-50:  $12,43 \pm 1,771$ ], quando comparada com a Riparina IV administrada sozinha [Rip.IV-50:  $19,27 \pm 3,211$ ]. (Figura 13)

**Figura 13.** Efeito da Riparina IV (50 mg/kg) v.o. , sozinha ou associados com ioimbina (2,5 mg/kg) i.p., sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

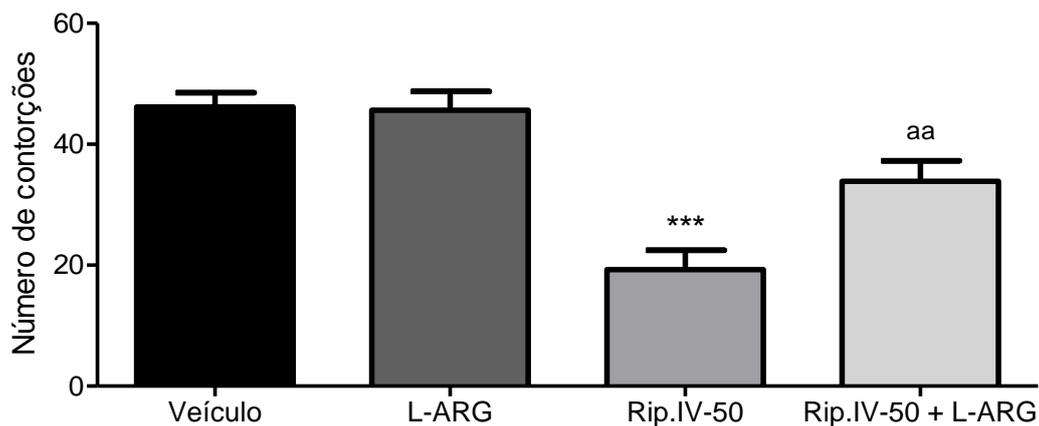


Veículo (3% de Tween em água destilada) e Riparina IV (Rip.IV; 50 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de ioimbina (IOIM; 2,5 mg/kg) e, então, 30 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. Foram utilizados de 7 a 14 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  vs Veículo (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

#### 4.1.7.4 Investigação do envolvimento do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da Riparina IV

O tratamento com L-arginina sozinha, (150 mg/kg; i.p.), substrato da NOS, não foi capaz de diminuir significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético [L-ARG:  $45,63 \pm 3,122$ ;  $p > 0,05$ ]. O pré-tratamento com L-arginina reverteu significativamente a atividade antinociceptiva induzida pela Riparina IV na dose de 50 mg/kg ( $p < 0,01$ ) [Rip.IV-50 + L-ARG:  $33,88 \pm 3,420$ ], quando comparada com a Riparina IV administrada sozinha [Rip.IV-50:  $19,27 \pm 3,211$ ]. (Figura 14)

**Figura 14.** Efeito da Riparina IV (50 mg/kg) v.o., sozinha ou associada com L-arginina (150 mg/kg) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (Rip.IV 50 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min antes da administração de L-arginina (L-ARG; 150 mg/kg) e, então, 30 minutos depois foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M do número de contorções registrado durante 20 minutos. Foram utilizados de 8 a 12 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo, <sup>aa</sup>  $p < 0,01$  vs Rip.IV-50 (ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*).

## 4.2 Avaliação da atividade locomotora

### 4.2.1 Teste da barra giratória (*rota Rod*)

No teste da barra giratória não observou-se diferença significativa no número de quedas entre os grupos tratados com veículo ou Riparina IV 25 e 50 mg/kg, v.o. Os animais tratados com diazepam (2 mg/kg) , i.p. demonstraram maior dificuldade em se manter na barra giratória, exibindo um aumento significativo no número de quedas ( $p < 0,001$ ). (Tabela 3)

**Tabela 3. Efeito da Riparina IV sobre o número de quedas no teste da barra giratória**

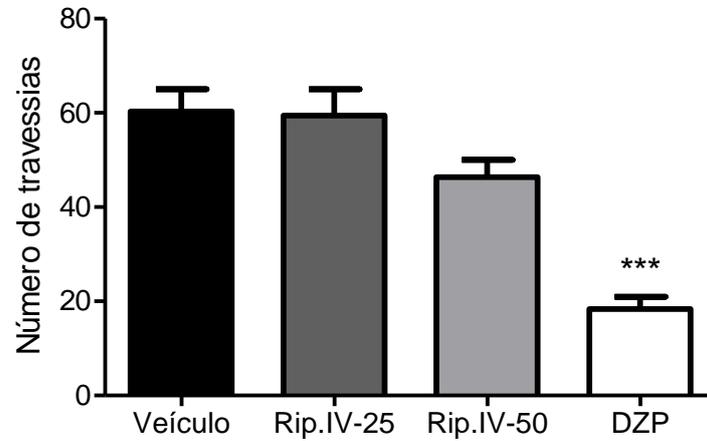
Grupo	Número de quedas/mínimo e máximo
Veículo	0 (0-1)
Riparina IV - 25 mg/kg	1 (0-2)
Riparina IV - 50 mg/kg	1 (0-1)
Diazepam 2 mg/kg	3 (1-3) ***

Os valores representam a mediana e, entre parênteses, os valores mínimo e máximo para cada grupo. Os animais foram previamente tratados com veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV 25 e 50 mg/kg e Diazepam 2 mg/kg. Foram utilizados de 6 a 8 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  Kruskal-Wallis e Dunns, *post hoc*.

### 4.2.2 Teste do campo aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE) foi o parâmetro observado, e o resultado foi expresso como número de cruzamentos. A Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg não alterou a atividade locomotora dos animais [Rip.IV-25:  $59,43 \pm 5,593$ ; Rip.IV-50:  $46,38 \pm 3,688$ ] em relação ao veículo [ $60,29 \pm 4,719$ ]. O diazepam 2 mg/kg, i.p., utilizado como droga de referência, reduziu a atividade locomotora em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) [DZP:  $18,38 \pm 2,577$ ]. (Figura 15)

**Figura 15. Efeito da Riparina IV e do Diazepam sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) no teste do campo aberto.**



Veículo (3% de Tween em água destilada), Riparina IV (25 e 50 mg/kg) foram administrados 60 minutos antes do teste. Diazepam 2 mg/kg foi administrado 30 minutos antes do teste. Os valores apresentam a média  $\pm$  E.P.M. do número de travessias durante 5 minutos. Foram utilizados de 7 a 8 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA seguido de Student Newman Keuls *post hoc*).

## 5 DISCUSSÃO

O alívio da dor é atualmente visto como um direito humano básico, sendo não somente uma questão clínica, mas também algo ético que envolve todos os profissionais de saúde (COUSINS, 2000). Uma série de avanços foram realizados no que se refere ao controle da dor, porém apesar do desenvolvimento de numerosos medicamentos analgésicos, muitos pacientes ainda vivenciam dores severas (YATES *et al.*, 1998). Dessa forma, o estudo de novas substâncias com potencial analgésico é fundamental no incremento de novos recursos que auxiliem no manejo do que é considerado o 5º sinal vital.

Existem diversos modelos utilizados para a investigação de compostos com atividade analgésica, e vários de nocicepção, em animais de laboratório, são atualmente disponíveis. Entretanto, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como reprodutibilidade, simplicidade e possibilidade de serem correlacionadas com estudos clínicos (DICKENSON; BESSON, 1997).

Os modelos utilizados na triagem de moléculas com potencial antinociceptivo comumente baseiam-se na observação da resposta animal frente à utilização de estímulos de diversos tipos e duração, e são divididos em três categorias: os que utilizam os estímulos mecânicos, térmicos e químicos. (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Com o objetivo de investigar uma possível atividade antinociceptiva da Riparina IV, realizamos inicialmente o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, descrito por Koster *et al.*, 1959. Embora pouco específico, esse modelo apresenta uma boa sensibilidade, podendo assim ser utilizado como uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

A injeção de ácido acético no peritônio dos animais provoca um estiramento visceromotor ou contorção característicos, com alternância de flexões e extensões abdominais (NESS; GEBHART, 1990). A atividade do ácido acético em produzir esse comportamento deve-se à liberação de substâncias endógenas que excitam as terminações nervosas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, prostaglandinas e bradicinina, oriundos de macrófagos e mastócitos residentes no peritônio (COLLIER *et al.*, 1968; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001).

Não obstante à ação dos mediadores inflamatórios, o comportamento das contorções abdominais também pode ser mediado pela diminuição do pH, que estimula canais de cátions não-seletivos, como os receptores ASICs e TRPV1 localizados nos neurônios aferentes primários (IKEDA *et al.*, 2001; JULIUS *et al.*, 2001; COUTAUX *et al.*, 2005).

A Riparina IV nas doses de 25 e 50 mg/kg, administrada por via oral, diminuiu de forma significativa a nocicepção induzida pelo ácido acético, assim como a indometacina, um antiinflamatório não-esteroidal utilizado como droga de referência no teste, indicando um efeito antinociceptivo.

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um teste robusto e reprodutível em camundongos sendo demonstrado o envolvimento de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>, histamina, bradicinina e serotonina (DERAEDT *et al.*, 1976; GUO *et al.*, 2008). Várias classes de drogas são capazes de suprimir ou diminuir as contorções induzidas pelo ácido, dessa forma, antihipertensivos, antihistamínicos, antidepressivos tricíclicos, narcóticos e anti-inflamatórios não esteróides são exemplos de classes com efeito antinociceptivo neste teste. O amplo espectro de drogas efetivas neste modelo tornam limitadas as conclusões obtidas através de seus resultados no que concerne à elucidação da mecânica de ação de uma substância teste, caso não sejam realizadas manipulações farmacológicas específicas. (COLLIER *et al.*, 1968; STEPANOVIC-PETROVIC *et al.*, 2008).

Para uma melhor caracterização e objetivando avaliar o efeito antinociceptivo utilizamos além do teste de contorções induzidas por ácido acético o modelo experimental da placa quente, proposto por Huskaar *et al.*, (1986), afim de melhor avaliar a atividade da droga estudada. Este teste confere uma resposta operante a um estímulo térmico mediada por integração central, e é considerado um método de avaliação dos efeitos antinociceptivos supra-espinhais (YAKSH; RUDY, 1997; JINSMAA *et al.*, 2004). Esse modelo de dor aguda reflete a atividade das fibras aferentes sensíveis à temperatura e das fibras A-δ e C, com provável envolvimento dos receptores TRPV1, com participação da substância P agindo como um transmissor das vias aferentes na medula espinhal (JINSMAA *et al.*, 2004; OHKUBO, *et al.*, 1990).

O tratamento oral com a Riparina IV apresentou efeito antinociceptivo frente ao estímulo térmico no teste da placa quente, indicando que a substância em estudo provavelmente não apresenta atividade antinociceptiva central. Já o tratamento intraperitoneal com morfina, um analgésico opióide, aumentou significativamente o tempo de latência em resposta ao calor. Dessa forma, excluímos a hipótese de um envolvimento central na atividade da Riparina IV.

Para verificar a efetividade da Riparina IV em outro modelo, utilizamos o teste da nocicepção induzida pela formalina, o que nós permitir dissociar dois eventos de natureza distinta, ou seja, a nocicepção química direta e a nocicepção de origem inflamatória. A injeção subcutânea de formalina na pata do animal provoca uma série de comportamentos estereotipados - dentre eles os atos de lambear, elevar ou recolher a pata - que podem ser considerados como parâmetros confiáveis na mensuração da nocicepção do animal. (TAYLOR *et al.*, 1995). Este é um modelo clássico no estudo de drogas com ação analgésica e antiinflamatória, por gerar dor persistente produzida pela injeção intraplantar da solução de formalina.

Assim, a análise do teste é dividida em duas fases, sendo que a primeira é caracterizada pela estimulação direta dos neurônios nociceptivos e pode ser suprimida pela administração de analgésicos de ação central, como por exemplo morfina, petidina e codeína (HUNSKAAR; HOLE, 1987; ROCHA *et al.*, 2008), e a segunda pela liberação de mediadores pró-inflamatórios - prostaglandinas, histamina, serotonina, somatostatina, bradicinina - (SHIBATA *et al.*, 1989; MALMBERG; YAKSH, 1992) e estimulação dos receptores opióides periféricos (OLUYOMI *et al.*, 1992) e TRPA1 (MCNAMARA *et al.*, 2007), sendo esta fase antagonizada por antiinflamatórios não-esteroidais, glicocorticóides e analgésicos de ação central (OHKUBO *et al.*, 1989; DOAK; SAWYNOK, 1997; PARADA *et al.*, 2001).

Interessantemente Hunskaar e Hole demonstraram em 1987 que o paracetamol era capaz de diminuir o tempo de lambadura tanto na primeira fase como na segunda o que sugeria, de acordo com as particularidade do modelo, que o paracetamol possuía ação central. Em 2002, Chandrasekharan *et al.* descreveram a isoenzima COX-3 ou COX-1b sendo posteriormente atribuído à inibição central essa enzima o mecanismo de ação do paracetamol. Isto demonstra que o teste é sensível analgésicos de ação central moderados e não somente a drogas com eficácia clínica semelhantes a derivados opióides.

Baseado nos resultados obtidos no teste de nocicepção induzida pela formalina, é possível sugerir que o efeito antinociceptivo demonstrado pela Riparina IV é voltado a um mecanismo de ação periférico, visto que o tratamento com a droga estudada somente foi capaz de reduzir o tempo de lambertura da pata apenas na segunda fase do teste. Esse resultado corrobora com os dados obtidos no teste da placa quente, onde os animais tratados com Riparina IV demonstraram um comportamento semelhante àqueles tratados com veículo em relação ao tempo de latência em resposta ao estímulo gerado pela placa aquecida.

A suposição de que a Riparina IV é uma substância analgésica com ação sobre a nocicepção de origem inflamatória tornou-se mais clara quando foi realizado o teste de hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, que, quando comparado aos testes de nocicepção induzida por agentes químicos, apresenta uma importante vantagem, pois permite uma dissociação entre a sensibilização dos nociceptores (pela injeção de um flogógeno ou de um mediador inflamatório específico, como uma citocina) e um comportamento nociceptivo espontâneo (nocicepção manifesta) induzida por um estímulo químico. (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

A injeção de carragenina na pata do animal gera um processo inflamatório que leva ao recrutamento de neutrófilos, além de estimular a produção de TNF- $\alpha$ , que por sua vez, induz a liberação de Il-1 $\beta$ , bem como de Il-6 e Il-8. As interleucinas 1 $\beta$  e 6, agem através de uma via dependente de prostaglandinas, gerando uma hipernocicepção inflamatória; já a Il-8 age através de uma via envolvendo aminas simpatomiméticas. (CUNHA *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 1992). A inflamação evocada pela carragenina envolve ainda a liberação de histamina, serotonina e bradicinina. (CUNHA *et al.*, 2005). Com relação a bradicinina, ela parece não apenas ativar nociceptores e induzir respostas nociceptivas, Ferreira *et al.* (1993) sugeriram que a bradicinina é um mediador inicial pró-nociceptivo que leva a liberação de TNF- $\alpha$  e então Il-1 $\beta$ , Il-6, Il-8 o que pode levar a produção/liberação de prostanoídes ou aminas simpatomiméticas.

Dessa forma, a aplicação intraplantar de carragenina é o agente central utilizado em modelo de inflamação e nocicepção empregado em “screening” de drogas com ação antiinflamatória e analgésica (CUNHA *et al.*, 2005). Empregamos, então, a carragenina como agente indutor de hiperalgisia inflamatória para testar o tratamento dos animais com a Riparina IV, e nossos resultados mostraram que ambas as doses inibiram a hipernocicepção

induzida pela carragenina. Esse efeito antihiperálgico pode ocorrer devido ao bloqueio da produção de citocinas e quimiocinas, e corrobora com os resultados obtidos nos testes de contorção e da placa quente, confirmando uma ação antinociceptiva periférica.

A ação antinociceptiva ou antihiperálgica periférica pode ocorrer em diversos pontos da cascata de produção de interleucinas, prostanóides ou ainda sobre receptores de mediadores plasmáticos ou neurotransmissores. O glutamato, por exemplo, é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivo (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Os receptores NMDA pré-sinápticos localizados nas terminações nervosas de fibras de pequeno diâmetro participam da transmissão nociceptiva facilitando e prolongando-a através da liberação de substância P, de forma a mediar o surgimento de hiperálgia e alodínia (LIU; MANTYH; BASBAUM, 1997).

Diversos estudos de drogas com ação antinociceptiva, tanto periférica quanto central, demonstraram uma interação com mecanismos dependentes dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou metabotrópicos (BATISTA *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2005; SCHEIDT *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2009), confirmando a participação não somente dos NMDA, mas também dos outros receptores glutamatérgicos no processo nociceptivo. Outro estudo, realizado por Fisher e Coderre (1996) sugeriu uma interação dos receptores metabotrópicos com os NMDA na nocicepção induzida pela formalina.

Os resultados demonstraram que a Riparina IV é capaz de reduzir a nocicepção associada à aplicação intraplantar de glutamato. A administração periférica (BEIRITH *et al.*, 2002) e intratecal (SHIM *et al.*, 2007) de glutamato gera resposta comportamental sugestiva de dor. A administração do antagonista de receptores NMDA, MK-801, levou a uma diminuição significativa do tempo de lambertura da pata dos animais tratados com a droga estudada, semelhante ao efeito ocorrido com a Riparina IV.

Tomando esses resultados junto com as observações de Zanh e Breenan (1998) e Zanh *et al.* (1998), que demonstraram que a administração de antagonista dos receptores NMDA é capaz de bloquear a hiperálgia inflamatória induzida por carragenina, o que não é observado com o bloqueio dos receptores do tipo AMPA.

Os membros da família de canais iônicos TRP são moléculas fundamentais na detecção de estímulos nódicos, e são capazes de transduzir respostas a estímulos mecânicos e químicos (STUCKY *et AL.*, 2009). Os TRPV1 (ou VR1) foram original descritos como receptores das substancias ativas pungentes, como a capsaicina. Na captação de estímulos nociceptivo os receptores VR1 estão envolvidos na transdução de estímulos térmicos e químicos associados a diversas substâncias além da capsaicina como por exemplo a resinoferatoxina, forbol-12-miristate13-acetate, produtos da via lipoxigenase, leucotrieno B4, Forbol-12-phenilacetato 13-acetato 20-homovanilato. (CATERINA *et al.*, 1997; FEIN, 2011).

Esses receptores estão localizados heterogeneamente em uma população de fibras aferentes primarias de pequeno diâmetro, e em terminais de fibras aferentes que se projetam para as laminais superficiais do corno dorsal, principalmente nas lâminas I e II (TOMINAGA *et al.*, 1998). Assim, esses receptores são transdutores de estímulos físicos e químicos que promovem a dor, e são sensíveis não somente ao calor nódico, mas também a alterações moderadas do pH, e à concentração de cátions divalentes, onde mesmo as pequenas alterações na concentração desses cátions pode influenciar a magnitude das respostas nociceptivas mediadas pelos TRPV1 (CATERINA *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 1998; AHERN *et al.*, 2005).

Andadre *et al.* (2008) demonstraram que a injeção de um agonista dos receptores TRPA1 na pata do animal, provoca um comportamento nociceptivo mediado pela ativação desses receptores presentes nas fibras C dependentes de capsaicina, com liberação de histamina - principalmente através de mastócitos - e participação de taquicininas, através dos receptores NK1. Utilizando procedimento semelhante, os resultados obtidos do nosso estudo mostraram que a Riparina IV administrada por via oral (doses de 25 e 50 mg/kg) e o vermelho de rutênio (3 mg/kg), droga de referência, foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela administração de capsaicina em camundongos, sugerindo o envolvimento deste receptor no efeito antinociceptivo da Riparina IV.

A ativação desses receptores está envolvida no mecanismo de vários modelos animais de nocicepção, como no modelo de contorções abdominais, onde a injeção de ácido acético no peritônio dos animais provoca uma diminuição do pH, ativando-os, na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, onde a injeção de um agonista desses receptores promove sua ativação direta, induzindo um comportamento de lambadura da pata do animal, e

no modelo da formalina, quando a administração intradérmica dos antagonistas vermelho de rutênio e capsazepina foi capaz de reverter a segunda fase do teste (IKEDA *et al.*, 2001; SANTOS; CALIXTO, 1997).

Dessa forma é plausível imaginar que há participação do bloqueio de receptores TRPV1 ou interferências na cascata de mediação iniciada pela ativação desse receptor, não só no teste realizado com a aplicação direta de capsaicina, mas também nos resultados obtidos nos testes da formalina, contorção abdominal induzida por ácido acético e no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina.

A superfamília de receptores TRP possui mais de 25 membros e alguns deles estão envolvidos na captação de estímulos sensoriais, temos, além do TRPV1, os receptores de potencial melastatina oito (TRPM8) e Anquirina hum (TRPA1). Envolvido com a ativação pelo frio, o canal iônico TRPM8, está localizado nas fibras C e A- $\delta$  (TAKASHIMA *et al.*, 2007) do sistema nervoso periférico, semelhante aos TRPV1, especialmente nos gânglios da raiz dorsal, trigêmeo, e nodoso (MCKEMY *et al.*, 2002; PEIER *et al.*, 2002).

TRPM8 exibe um limiar de ativação na faixa de 22 a 27 °C (MCKEMY *et al.*, 2002; PEIER *et al.*, 2002), e é ativado por várias substâncias sintéticas responsáveis por sensações de frio moderado ou “frescor”, como por exemplo icilina e eucaliptol (MCKEMY *et al.*, 2002; PEIER *et al.*, 2002; BEHRENDT *et al.*, 2004), e parece ser inibida pelo ácido, etanol e ativação de PKC (WEIL *et al.*, 2005; PREMKUMAR *et al.*, 2005; BEHRENDT *et al.*, 2004).

É provável que a ativação dos receptores TRPM 8 não seja suficiente para produzir uma analgesia satisfatória nos casos de hiperalgesia e alodinia. (SU *et al.*, 2011). No entanto, Takashima *et al.* (2007) aventaram a possibilidade da sensação de queimação que é experimentada a temperaturas muito baixas serem devidas a coexpressão de receptores TRPV1 e TRPM8 na mesma fibra aferente. Nessa linha Su *et al.* (2011) relataram que a ativação dos TRPM8 pode provocar uma hipersensibilidade aos estímulos frios, corroborando com os achados de Proudfoot *et al.* (2006) de que o mentol, um agonista desses receptores, pode apresentar propriedades pró-nociceptivas quando administrado em altas doses. Temos ainda o fato desse canal ser fundamental para a analgesia promovida por pequenas doses de compostos de refrescantes (PROUDFOOT *et al.*, 2006; DHAKA *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o tratamento oral com Riparina IV em ambas as doses foi capaz de inibir a ação nociceptiva provocada pela aplicação de mentol nas patas dos animais, porém não de cinamaldeído – agonista dos receptores TRPA1. Dessa forma, a droga em estudo apresenta uma atividade antinociceptiva relacionada aos receptores TRPM8, não havendo participação dos receptores TRPA1 em seu mecanismo de ação.

Quando comparados aos receptores TRPA1, os TRPM8 apresentam uma temperatura de ativação significativamente maior, resposta mais rápida ao frio e menor sensibilidade, em geral, à capsaicina (KARASHIMA *et al.*, 2009).

Os canais de potássio ATP-dependentes estão distribuídos em uma variedade de tipos de tecidos e células, onde acoplam alterações metabólicas intracelulares com a actividade eléctrica da membrana plasmática, desempenhando assim um papel importante tanto nas células normais quanto em processos patológicos. (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que alguns receptores, como os  $\alpha$ 2-adrenérgicos,  $\mu$  e  $\delta$  opióides, e os receptores 5-HT1A são acoplados à classe dos canais de sódio ATP-dependentes, e que a abertura de estes canais está envolvida no efeito antinociceptivo dos agonistas destes receptores (GALEOTTI *et al.*, 1999; OCAÑA; BAEYENS, 1993; RODRIGUES; DUARTE, 2000; ROBLES *et al.*, 1996).

Destaca-se, ainda, a relação os canais de potássio ATP-dependentes e a via do óxido nítrico, como proposto por Soares *et al.* (2000). Segundo esses autores, a liberação do óxido nítrico pode promover a ativação dos canais de potássio no terminal nociceptivo, induzindo a sua dessensibilização e, dessa forma, promovendo analgesia.

No presente estudo, o bloqueio dos canais de potássio ATP-dependentes não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva provocada pela Riparina IV, sendo descartado o seu envolvimento com o mecanismo de ação da droga estudada.

A partir dessas observações, estudamos o envolvimento do óxido nítrico e das vias adrenérgica e serotoninérgica no mecanismo de ação da Riparina IV, afim de confirmar as hipóteses relatadas na literatura.

As vias serotoninérgicas e noradrenérgicas são implicadas no processo de controle da dor como mediadores do sistema descendente inibitório na medula espinal. (MARKS *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Korzeniewska-Rybicka e Plaznik (2001) indicou a participação de ambas as vias em modelos de dor visceral, salientando que, dependendo dos receptores ativados, a noradrenalina e a serotonina poderiam agir não só bloqueando, mas também induzindo o comportamento nociceptivo.

O mecanismo de ação dos receptores serotoninérgicos na modulação da dor ainda não foi completamente elucidado, porém estudos apontam para ações de alguns desses receptores: o receptor 5-HT<sub>1</sub> parece apresentar uma ação dual no processo antinociceptivo (BARDIN; COLPAERT, 2004), porém alguns autores consideram a sua ação enquanto antinociceptiva (KORZENIEWSKA- RYBICKA; PLAZNIK, 2001), e outros consideram que a ativação desse receptor não possui ação antinociceptiva (MILLAN, 1994). Os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, e a interação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, parecem agir de forma antinociceptiva, enquanto o receptor 5-HT<sub>3</sub> sozinho, possui uma ação pró-nociceptiva, através de uma via descendente que facilita a nocicepção (BARDIN *et al.*, 2000; DOGRUL; OSSIPOV; PORRECA, 2009).

Em relação aos receptores adrenérgicos, está bem estabelecido na literatura que os receptores  $\alpha$ -1 apresentam uma ação hiperalgésica e os  $\alpha$ -2, uma ação antinociceptiva. (KORZENIEWSKA-RYBICKA; PLAZNIK, 2001; BINDER *et al.*, 2004; DOGURL; COSKUN; UZBAY, 2006).

Dentre os subtipos de receptores, destacam-se o  $\alpha$ 2<sub>A</sub>, que possuem ação antinociceptiva somática, visceral e um efeito antihiperalgésico inflamatório, e o  $\alpha$ 2<sub>C</sub>, quem compartilha do último dos efeitos do  $\alpha$ 2<sub>A</sub>. (MANSIKKA *et al.*, 2004; TOMIC *et al.*, 2007).

No presente estudo, a depleção das reservas de serotonina através do pré-tratamento dos animais com pCPA, e o antagonismo dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, utilizando o pré-tratamento com ioimbina, não foram capazes de reverter a ação antinociceptiva da Riparina IV na dose de 50mg/kg, confirmando que ambos os sistemas serotoninérgico e  $\alpha$ 2-adrenérgico não estão relacionados com o mecanismo de ação da droga estudada.

O NO é um gás solúvel que envolve a regulação de várias funções biológicas, dentre elas o relaxamento do músculo vascular e não vascular, inibição de agregação plaquetária, inibição de agregação leucocitária no endotélio e como transdutor no sistema nervoso central (LIAUDET *et al.*, 2000).

Um estudo realizado por Kawabata *et al.* (1994) demonstrou que a L-arginina, substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS), aumenta significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela formalina, sugerindo que o NO possui uma atividade pró-nociceptiva, visto que o mesmo é o produto final da interação entre L-arginina e a enzima NOS.

Outros autores provaram que a ação de inibidores da NOS é capaz de produzir um comportamento antinociceptivo em modelos animais, corroborando com a hipótese de que o NO desempenha um papel na nocicepção (MOORE *et al.*, 1991; MOORE *et al.*, 1993).

Diante dessas informações, consideramos de extrema importância estudar o possível envolvimento da via metabólica do NO na atividade analgésica da Riparina IV. O pré-tratamento com L-arginina ocasionou uma reversão significativa da atividade antinociceptiva induzida pela Riparina IV na dose de 50 mg/kg, quando comparada com a Riparina IV administrada sozinha, indicando que a via do NO possui uma relação com o mecanismo de ação da droga estudada.

Ao analisar o comportamento dos animais em modelos de nocicepção, faz-se necessário também excluir a possibilidade de que a droga estudada esteja agindo não somente como analgésico, mas também como relaxante muscular ou depressor do sistema nervoso central. Em ambos os casos, o comportamento do animal pode encontrar-se alterado, como por exemplo o ato de lambar a pata, caracterizando um viés no estudo. Diante disso, foram realizados os testes do Rota Rod e campo aberto, afim de excluir a possibilidade de alguma dessas interferências na ação antinociceptiva da Riparina IV.

O teste do Rota Rod é um procedimento que requer que o animal mantenha o equilíbrio sobre um cilindro que movimenta-se com uma velocidade de rotação constante (DUNHAM; MIYA, 1957). Esse modelo é bastante utilizado para avaliar o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas em animais

(CARLINI; BURGOS, 1979), assim como o déficit motor provocado por disfunções cerebelares, injúrias cerebrais provocadas por trauma ou doenças degenerativas induzidas em animais (HAMM, 1994; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006; SHIOTSUKI *et al.*, 2010).

O tratamento oral com Riparina IV não afetou a coordenação motora dos animais no teste do rota Rod, diferentemente do tratamento com diazepam na dose de 2 mg.kg, que sabidamente provoca um relaxamento muscular nos animais, aumentando de maneira significativa o número de quedas da barra giratória.

O teste do campo aberto foi realizado para confirmar se a droga estudada apresentava uma ação sedativa ou depressora nos animais tratados. A literatura demonstra que drogas como benzodiazepínicos e outros ansiolíticos (ONAIVI *et al.*, 1992) diminuem o comportamento exploratório do animal.

O tratamento oral com Riparina IV não alterou de maneira significativa o número de cruzamentos observados no teste do campo aberto, diferentemente dos animais tratados com diazepam na dose de 1mg/kg, que apresentaram uma diminuição do comportamento exploratório quando comparados àqueles tratados com veículo.

Os resultados obtidos nos testes do Rota Rod e campo aberto demonstram que a atividade antinociceptiva da Riparina IV independe de algum efeito relaxante muscular ou de ação central.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Riparina IV foi testada em modelos animais de nocicepção, e os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- Possui atividade antinociceptiva, evidenciada nos modelos de nocicepção química induzida pelo ácido acético, formalina (segunda fase) e hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina;
- A ação antinociceptiva parece não estar relacionada com mecanismos centrais, pois não houve qualquer efeito sobre o teste da placa quente;
- Os efeitos antinociceptivos parecem estar relacionados aos receptores TRP, especificamente aos TRPV1 e TRPM 8;
- Os receptores glutamatérgicos também estão envolvidos na atividade antinociceptiva da Riparina IV;
- O mecanismo de ação da Riparina IV não está relacionado com a ativação dos canais de potássio ATP-dependentes, receptores serotoninérgicos ou com os receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos;
- O mecanismo de ação da Riparina IV envolve, de alguma forma, a via do óxido nítrico;
- A atividade antinociceptiva da Riparina IV não se deve à alteração no comportamento motor do animal, relaxamento muscular ou sedação.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente trabalho indicam que a Ripaina IV apresenta importante efeito antinociceptivo evidenciado em diversos modelos experimentais de nocicepção, tornando essa substância e seus análogos possíveis alvos para a produção de novas drogas utilizadas no tratamento da dor.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT IV, J.P.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A.; BRYAN, J. Toward Understanding the Assembly and Structure of KATP Channels. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 227 - 245, 1998.
- AHERN, G.P.; BROOKS, I.M.; MIYARES, R.L.; WANG, X. Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 5109 – 5116, 2005.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 179-188.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v. 1000, p. 40–56, 2004.
- ANDRADE, E. L.; LUIZ, A. P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, p. 511 -520, 2008.
- ARAÚJO, F.L.O.; MELO, C.T.V.; ROCHA, N.F.M.; MOURA, B.A.; LEITE, C.P.; AMARAL, J.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Antinociceptive effects of (O-methyl) N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v. 380, p.337–344, 2009.
- BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p.849 - 857, 2004.
- BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazônica**, v. 18, p. 91-94, 1988.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Cad. Farm.**, v. 13, p. 85-102, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615-2617, 1987.
- BARDIN, L.; COLPAERT, F.C. Role of spinal 5-HT1A receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. **Eur. J. Pain**, v. 8, p. 253 - 261, 2004.
- BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v. 86, n. 1/2, p. 11 –18, 2000.
- BASBAUM. A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. **Ann. Neurol.**, v. 4, p.451-462, 1978.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 309-338, 1984.

BATISTA, M. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E. C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L. F. S.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 440, p. 299–303, 2008.

BEHRENDT, H. J.; GERMANN, T.; GILLEN, C.; HATT, H.; JOSTOCK, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 737 - 745, 2004.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, v. 969, p. 110-116, 2003.

BENEDIKT, J.; TEISINGER, J.; VYKLYCKY, L.; VLACHOVA, V. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulation its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. **J. Neurochem.**, v. 100, n. 1, p. 211-224, 2007.

BESSOU, P.; PERL, E.R. Response of Cutaneous Sensory Units with Unmyelinated Fibers to Noxious Stimuli. **J. Neurophysiol.**, v. 32, p. 1025-1043, 1969.

BINDER, W. ; MOUSA, S. A.; SITTE, N.; KAISER, M.; STEIN, C.; SCHÄFER, M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, n. 1, p. 92-100, 2004.

BRENNAN, F.; CARR, D.B.; COUSINS, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesth. Analg.**, v. 105, p. 205 – 221, 2007.

BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J. Physiol.**, v. 190, p. 541-562, 1967.

CALIXTO, J.B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América: a Personal Review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Rev. Assoc. Bras. Psiquiatr.**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da Riparina II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL TIRAMINA) em modelos experimentais.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CASTELO-BRANCO, U. J. V. **Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxybenzoyl)-tyramine.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.

CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (Parte 1). In: REUNIÃO ANUAL DE FESBE, 1991. Caxambu, MG. **Resumo VI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Caxambu, 1991. v. 69, p. 302.

CASTELO-BRANCO, U.V.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 19, p. 197-202, 2000.

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

CHUANG, H. H.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. The super-cooling agent ilicin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. **Neuron**, v. 43, n. 6, p. 859-869, 2004.

COLLIER, H.O.J.; DINNIEN, L.C.; CHISTINE, A.; JOHNSON, A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295, 1968.

CORREA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p.193-198, 1993.

COUSINS, M. J. Relief of acute pain: a basic human right? **Med. J. Australia**, v. 172, p. 3-4, 2000.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359–371, 2005.

CRAIG, A. D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 26, p. 1-30, 2003.

CRUZ, A. P. M.; ZANGROSSI-JUNIOR, H; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e suas implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicol. Teor. Pesqui.**, v. 13, p. 269-278, 1997.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765 - 767, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660 - 664, 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI, JR. W.A; J. S. SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, p. 1755 – 1760, 2005.

DERAEDT, S. JOUQUEY, J. BENZONI AND M. PETERFALVI. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Arch. Intern. Pharmacodyn.**, v. 224, p. 30-42, 1976.

DHAKA, A.; MURRAY, A.N.; MATHUR, J.; EARLEY, T.J.; PETRUS, M.J.; PATAPOUTIAN, A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron**, v. 54, p. 371–378, 2007.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer, 1997.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Formalin- induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5- hydroxytryptamine receptors subtypes. **Neuroscience**, v. 80, n. 3, p. 939 - 949, 1997.

DOGRUL, A.; COSKUN, I.; UZBAY, T. The contribution of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in peripheral imidazoline and adrenoceptor agonist-induced nociception. **Anesth. Analg.**, v. 103, p. 471- 477, 2006.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors. **Brain Res.**, v. 1280, p. 52 - 59, 2009.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208, 1957.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D.J. Synthetic analgesics. Iidithienyl – butenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

FEIN, A. **Nociceptores**: as células que sentem dor. Ribeirão Preto: Dor On Line, 2011.

FERNANDES, J.B.; GOTTHEB, O.R.; XAVIER, L.M. Chemosystematic implications of flavonoids in Aniba Riparia. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 6, p. 55, 1978.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FILLINGIM, R.B.; WALLACE, M.R.; HERBSTMAN, D.M.; RIBEIRO-DASILVA, M.; STAUD, R. Genetic contributions to pain: a review of findings in humans. **Oral. Dis.**, v. 14, p. 673–682, 2008.

FISHER, K.; CODERRE, T. J. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. **Pain**, v. 68, p. 255-263, 1996.

FRANÇA, N.C.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T.; MENDES, P.H.; MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L.; GOTTLIEB, H.E. Tri-O-methylgalangin from Aniba Riparia **Phytochemistry**, v. 15, p. 572, 1976.

- FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; TWARDOWSCHY, A.; SANTOS, A. C.; MAYER, B.; LUIZ, A. P.; SANTOS, C. A. M.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 122, p. 468 – 472, 2009.
- GALEOTTI, N.; GHERLARDINI, C.; VINCI, M. C.; BARTOLINI, A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of  $\alpha_2$ -adrenoceptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 1214-1220, 1999.
- GORDON, G.; WHITTERIDGE, D. W. Conduction-time for human pain sensation. **Lancet**, 245, 700-701, 1943.
- GUO, L.; YE, C.; CHEN, W.; YE, H.; ZHENG, R.; LI, J.; YANG, H.; YU, X.; ZHANG, D. Anti-Inflammatory and Analgesic Potency of Carboxyamidotriazole, a Tumorostatic Agent. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 325, p.10–16, 2008.
- HAMM, R.J.; PIKE, B.R.; O'DELL, D.M.; LYETH, B.G.; JENKINS, L.W. The Rotarod Test: An Evaluation of Its Effectiveness in Assessing Motor Deficits Following Traumatic Brain Injury. **J. Neurotrauma**, v. 11, p. 187 – 196, 1994.
- HARPER, A.A.; LAWSON, S.N. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. **J. Physiol.**, v. 359, p. 47-63, 1985.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behav. Brain Res.**, v. 21, p. 101-108, 1986.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.
- HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 83 – 91, 2001.
- IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v. 69, p. 2911 - 2919, 2001.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP), 1979. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 12 Aug. 2011.
- JACK, D. B. One hundred years of aspirin. **Lancet**, v. 350, p. 437- 479, 1997.
- JENSEN, T. S. Mechanism of neuropathic pain. In: CAMPBELL, J. N. (Ed.). **Pain: an updated review**. Seattle: IASP Press, 1996. p. 77-86.
- JINSMAA, Y.; OKADA, Y.; TSUDA, Y.; SHIOTANI, K.; SASAKI, Y.; AMBO, A.; BRYANT, S. D.; LAZARUS, L. H. Novel 2'6'-dimethyl-L-tyrosine-containing pyrazinone opioid mimetic  $\mu$ -agonist with potent antinociceptive activity in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, p. 432 – 438, 2004.

- JORDT, S.E.; MCKEMY, D.D.; JULIUS, D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 13, p. 487–492, 2003.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203 – 210, 2001.
- KARASHIMA, Y.; TALAVERA, K.; EVERAERTS, W.; JANSSENS, A.; KWAN, K. Y.; VENNEKENS, R.; NILIUS, B.; VOETS, T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **PNAS**, v. 106, p. 1273 - 1278, 2009.
- KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **Br. J. Pharmacol.**, 112, 547– 550, 1994.
- KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery . **Nat. Rev.**, v. 4, p. 206-220, 2005.
- KORZENIEWSKA-RYBICKA, I.; PŁAZNIK, A. Role of serotonergic and noradrenergic systems in a model of visceral pain. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 475–480, 2001.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.
- KRELING, M. C. G. D.; CRUZ, D. A. L. M.; PIMENTA, C. A. M. Prevalência de dor crônica em adultos. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 59, p. 509-513, 2006.
- LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. **Exp. Physiol.**, v. 87, p. 239–244, 2002.
- LE BARS, D.; GOZAIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.
- LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1772, p. 989-1003, 2007.
- LEWIS, T.; POCHIN, E. E. The double pain response of the human skin to a single stimulus. **Clin. Sci.**, v. 3, p. 67-76, 1937.
- LIAUDET L.; SORIANO F. G.; SZABÓ C. Biology of nitric oxide signaling. **Critic Care Med.**, v. 26, p. 37-52, 2000.
- LIU, H.; PATRICK, W. MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 386, p. 721 – 724, 1997.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J.Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, n. 1, p. 136-146, 1992.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nerve growth factors derive physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory nerves. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 48907-48913, 2003.

MANSIKKA, H.; LÄHDESMÄKI, J.; SCHEININ, M.; PERTOVAARA, A. Alpha (2A) Adrenoceptors contribute to feedback inhibition of capsaicin-induced hyperalgesia. **Anesthesiology**, v. 101, p.185-90, 2004.

MARKS, D. M.; SHAH, M. J.; PATKAR, A. A.; MASAND, P. S.; PARK, G.; PAE, C. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors for pain control: premise and promise. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 7, p. 331 - 336, 2009.

MCGRATH, P. J.; HUMPHREYS, P.; KEENE, D.; GOODMAN, J. T.; LASCELLES, M. A.; UNNINGHAM, S. J.; FIRESTONE, P. The efficacy and efficiency of an adolescent self-administered treatment migraine. **Pain**, v. 49, n. 3, p. 321-324, 1992.

MCKEMY, D. D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. **Mol. Pain**, v. 1, p. 16-22, 2005.

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 13525 - 13530, 2007.

MELKACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanism: A new theory. **Science**, v. 150, p. 971- 979, 1991.

MILLAN, M. J. Serotonin and pain: evidence that activation of 5- HT1A receptors does not elicit antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. **Pain**, v. 58, p. 45 - 61, 1994.

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **J. Neurosci. Meth.**, n. 158, p. 219 - 223, 2006.

MOORE, P. K.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z. A.; HART, S. L. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, p. 296 - 297, 1993.

MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z. A.; HART, S. L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 198-202, 1991.

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

NEWMAN, T. J.; CRAGG, G. M.; SANDER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002 **J. Nat. Prods.**, v. 66, p. 1022, 2003.

NICHOLSON, B. Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. **Am. J. Manag. Care**, v. 12, p. S256-S26, 2006.

OCAÑA, M.; BAEYENS, J.M. Differential effects of K<sup>+</sup> channel blockers on antinociception induced by  $\alpha_2$ -adrenoceptor, GABA<sub>B</sub> and  $\kappa$ -opioid receptor agonists. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1049-1054, 1993.

OHKUBO, T.; SHIBATA, M.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Roles of Substance P and Somatostatin on Transmission of Nociceptive Information Induced by Formalin in Spinal Cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 1261- 1268. 1990.

OLUYOMI, A. O.; HART, S. L.; SMITH, T. W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylnorphine in the formalin test. **Pain**, v. 49, p. 415-418, 1992.

ONAIWI, E. S.; MAGUIRE, P. A.; TSAI, N. F.; DAVIES, M. F.; LOEW, G. H. Comparison of Behavioral and Central BDZ Binding Profile in Three Rat Lines. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 43, p. 825 - 831, 1992.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 3779–3787, 2010.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-944, 2001.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 8, p. 55 - 68, 2009.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The Renaissance of Natural Products as Drug Candidates. **Science**, v. 310, p. 451, 2005.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; REEVE, A. J.; ANDRESSON, D. A.; STORY, G. M.; EARLEY, T. J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, p. 705-715, Mar. 2002.

PIMENTA, C. A. M. Fundamentos teóricos da dor e sua avaliação. In: CARVALHO, M. M. M. J. **Dor**: um estudo multidisciplinar. São Paulo: Summus, 1999. p. 159-173.

PIMENTA, C. A. M.; PORTINOI, A.G. Dor e cultura. In: CARVALHO, M. M. M. J. **Dor**: um estudo multidisciplinar. São Paulo: Summus, 1999. p. 159-173.

PORTO, C. C. **Exame Clínico**: bases para a prática médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PREMKUMAR, L. S.; RAISINGHANI, M.; PINGLE, S. G.; LONG, C.; PIMENTEL, F. Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 11322 - 11329, 2005.

PROUDFOOT, C. J.; GARRY, E. M.; COTTRELL, D. F.; ROSIE, R.; ANDERSON, H.; ROBERTSON, D. C.; FLEETWOOD-WALKER, S. M.; MITCHELL, R. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 1591 - 1605, 2006.

QUINEAT, A.; ANDREATA, R. H. Laureceae Jussieu na reserve ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo. **Rodriguésia**, v. 53, p. 59-121, 2002.

REID, G.; FLONTA, M. L. Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**, v. 413, p. 480, 2001.

RENN, C. L.; DORSEY, S. G. The physiology and processing of pain: a review. **AACN Clin. Issues**, v. 16, p. 277 – 290, 2005.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444–445, 1969.

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

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Lead: Past Successes and Present Day Issues. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, p. 43D-49D, 2008.

ROBLES, L. I.; BARRIOS, M.; DEL POZO, E.; DORDAL, A.; BAEYENS, J. M. Effects of K<sup>+</sup> channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 295, p. 181 - 188, 1996.

ROCHA F. F.; NEVES E. M. N.; COSTA E. A.; MATOS L. G.; MÜLLER A. H.; GUILHON G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 344-349, 2008.

ROCHA, N. F.; RIOS, E. R.; CARVALHO, A. M.; CERQUEIRA, G. S.; LOPES, A. DE A.; LEAL, L. K.; DIAS, M. L.; DE SOUSA, D. P.; DE SOUSA F. C. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v. 384, n.6, p.525-533, 2011.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 110 - 114, 2000.

ROSA K. A.; GADOTTI, V. M.; ROSA, A. O.; RODRIGUES, A. L. S.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neurosci. Lett.**, v. 381, p. 185 – 188, 2005.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 123- 133, 1998.

SAKURADA, T.; MATSUMARA, T.; MORIYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO, S.; SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin induced desensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 115-121, 2003.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.**, v. 235, p. 73 –76, 1997.

SCHAIBLE; H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, p. 237 - 243, 2004.

SCHEIDT, C.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 340–347, 2002.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metab. Clin. Exp.**, v. 57, p. S3-S9, 2008.

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora.** 103 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1996.

SHERRINGTON, C. **The integrative action of the nervous system.** Oxford: Oxford University Press , 1906.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

SHIM, E. J.; SEO, Y. J.; KWON, M. S.; HAM, Y. O.; CHOI, O. S.; LEE, J. Y.; CHOI, O. S.; LEE, J. Y.; CHOI, S. M. The intracerebroventricular kainic acid-induced damage affects animal nociceptive behavior. **Brain Res. Bull.**, v. 73, n. 4-6, p. 203-209, 2007.

SHIOTSUKI, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO, Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J. Neurosci. Meth.**, v. 189, p. 180 – 185, 2010.

SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO, M. A. K. F.; DUARTE, I. D. G. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor , sodium nitroprusside. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 400, p. 67 - 71, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. 2005. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/dorimpactos.asp>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO R.G.; PIZZA C.; ALTINIER G.; TUBARO A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 211 - 215, 2002.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; TOMIC, M. A.; VUCKOVIC, S. M.; PARANOS, S.; UGRESIC, N. D.; PROSTRAN, M. S.; MILOVANOVIC, S.; BOSKOVIC, B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth. Analg.**, v. 106, p. 1897 - 1903, 2008.

STORY, G. M.; PEIER, A. M.; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. **Cell**, v.112, p. 819-829, 2003.

STUCKY, C. L.; DUBIN, A. E.; JESKE, N. A.; MALIN, S. A.; MCKEMY, D. D.; STORY, G. M. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Res. Rev.**, v. 60, p. 2 - 23, 2009.

SU, L.; WANG, C.; YU, Y.; REN, Y.; XIE, K.; WANG, G. Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain. **BMC Neurosci.**, v. 12, p. 1 – 15, 2011.

TAKASHIMA, Y.; DANIELS, R. L.; KNOWLTON, W.; TENG, J.; LIMAN, E. L.; MCKEMY, D. D. Diversity in the Neural Circuitry of Cold Sensing Revealed by Genetic Axonal Labeling of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Neurons. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 51, p. 14147-14157, 2007.

TANG, L.; CHEN, Y.; CHEN, Z.; BLUMBERG, P.M.; KOZIKOWSKI, A.P.; WANG, Z.J. Antinociceptive pharmacology of n-(4-chlorobenzyl)-n'-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzyl) thiourea, a high-affinity competitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 321, p. 791–798, 2007.

TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Persistent cardiovascular and behavioural nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 7575-7584, 1995.

TEIXEIRA, M.J. Dor e depressão. **Rev. Neurocienc.**, v. 14, p. 44-53, 2006.

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

TOMIC, M. A.; VUCKOVIC, S. M.; STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; UGRESIC, N. D.; PARANOS, S. L.; PROSTRAN, M. S.; BOSKOVIC, B. The Involvement of Peripheral  $\alpha$ 2-adrenoceptors in the antihyperalgesic effect of oxcarbazepine in a rat model of inflammatory pain. **Anesth. Analg.**, v.105, p.1474 –81, 2007.

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

VOILLEY, N.; DE WEILLE, J.; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid antiinflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 8026 - 8033, 2001.

WALDMANN, R.; LAZDUNSKI, M. H<sup>+</sup>-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, p. 418-424, 1998.

WEIL, A.; MOORE, S. E.; WAITE, N. J.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M. J. Conservation of Functional and Pharmacological Properties in the Distantly Related Temperature Sensors TRPV1 and TRPM8. **Mol. Pharmacol.**, v. 68, n. 2, p. 518-527, 2005.

WILLIS, W. D. Nociceptive Pathways: Anatomy and Physiology of Nociceptive Ascending Pathways. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 308, n.1136, p. 253-268, 1985.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A.; Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 282, p. 1242-1246, 1997.

YATES, P.; DEWAR, A.; EDWARDS, H.; FENTIMAN, B.; NAJMAN, J.; NASH, R.; RICHARDSON, V.; FRASER, J. The prevalence and perception of pain amongst hospital in-patients. **J. Clin. Nurs.**, v. 7, p. 521 - 530, 1998.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Lack of Effect of Intrathecally Administered N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists in a Rat Model for Postoperative Pain. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 143-156, 1998.

ZAHN, P. Z.; UMALI, E.; BRENNAN, T. J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p. 213-223, 1998.

ZOTTERMAN, Y. Studies in the peripheral mechanism of pain. **Acta Med. Scand.**, v. 80, p.185-242, 1933