



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

**MARÍLIA LEITE DIAS**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA IV EM MODELOS ANIMAIS:  
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS**

**FORTALEZA**

**2017**

MARÍLIA LEITE DIAS

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA IV EM MODELOS ANIMAIS:  
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS

Tese 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 Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa  
Florenço de Sousa

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D533e Dias, Marília.  
Efeito antinociceptivo da Riparina IV em modelos animais : mecanismos de ação envolvidos / Marília Dias. – 2017.  
80 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
1. Nocicepção. 2. Via da PKA . 3. Potencial de ação composto. I. Título.

CDD 615.1

---

MARÍLIA LEITE DIAS

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA IV EM MODELOS ANIMAIS:  
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Orientadora - Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso  
Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Rodrigo Fragoso de Andrade  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva  
Unichristus - Centro Universitário Christus

## AGRADECIMENTOS

À Deus, tudo por Ele e para glória Dele!

À Nossa Senhora, por guiar meus passos a todo momento, e me conduzir pelos bons caminhos.

Aos meus amados pais e irmão, por terem apoiado minhas decisões em todos os momentos da minha vida. Não existo sem vocês!

Ao meu amado marido e parceiro Rafael, pela dedicação, companheirismo, generosidade, humildade e seu grande amor. Aquele que traz luz e sorrisos aos meus dias.

Ao meu amado anjo Rick, que me ensinou as maiores lições que já aprendi.

Aos meus eternos parceiros e amigos de laboratório, que sempre estiveram presentes e dispostos a contribuir com esse e todos os outros trabalhos. Amigos para a vida toda! Alyne Mara (minha irmã), Leonardo Freire, Nayrton Flávio e Emiliano Rios.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francisca Cléa Florenço de Sousa, que me acolheu no laboratório e abriu as portas da pós-graduação para mim.

Aos professores Roberto César e Ricardo Lima por se fazerem tão importantes para o desenvolvimento desse trabalho. Nunca esquecerei da sua disponibilidade em me ajudar!

À minha eterna mestra Cristiane Sá Roriz, pelos seus conselhos e seu direcionamento, que me trouxeram à pós-graduação em Farmacologia.

Ao professor Fabrício Bitu e às atividades de digitação de fichas de pacientes no NEPE, que despertaram meu amor pela Farmacologia.

À querida amiga Aline Albuquerque, por seu direcionamento e por me inspirar.

Aos professores doutores que participaram da banca, por quem tenho profunda admiração científica, por estarem à disposição para participar desse dia tão especial.

A todos os amigos do laboratório de Neurofarmacologia e colegas do doutorado, por compartilharem das alegrias e dificuldades comigo.

Aos funcionários e amigos do laboratório Vilani e Lena, sempre presentes e dispostas a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos colaboradores do Laboratório de Eletrofisiologia, que me acolheram com todo carinho e me ensinaram com toda paciência e dedicação, em especial aos professores Henrique Leal Cardoso, Kerly Shamira e Walber.

Ao querido Pedro Militão, sempre disposto a colaborar e auxiliar quando eu precisei.

Aos queridos pós-graduandos do LEF, Carol, Klausen, Thaís, Átila e todos que compartilharam comigo muitos momentos agradáveis, difíceis, muitos risos, tapiocas e chás durante os momentos em que estivemos juntos.

Aos queridos colegas de trabalho, que acompanharam essa jornada e compartilharam comigo das angústias do Doutorado, e da motivação para que eu conseguisse terminar esse ciclo.

A todos os que participaram de forma indireta para a concretização desse sonho, enviando boas vibrações, orando por mim, e me dando força para nunca desistir.

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

### **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA IV EM MODELOS ANIMAIS: MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS**

Do fruto verde da espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez, são encontradas algumas alcanoides, denominadas Riparinas, que possuem um interessante potencial terapêutico. Através de um processo de modificação química, foi sintetizado um análogo estrutural dessas substâncias, a Riparina IV. Estudos anteriores mostraram que a mesma apresentou efeitos ansiolítico e antidepressivo, bem como efeito antinociceptivo. O presente trabalho foi desenvolvido com a aprovação pela CEUA/UFC (nº 06/16), com o objetivo de avaliar o papel da Rip.IV no processo de nocicepção e os mecanismos farmacológicos relacionados à sua atividade. Inicialmente, foram utilizados camundongos *Swiss* machos e realizados modelos experimentais de nocicepção: contorções induzidas pelo ácido acético, hipernocicepção mecânica induzida por agentes algésicos (PGE<sub>2</sub> e epinefrina), teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído, mentol, salina ácida, PMA e 8-Br-AMPC. Além dos testes comportamentais, foi realizada análise do efeito da Rip.IV sobre o Potencial de Ação Composto (PAC) no nervo ciático de ratos Wistar. No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético foi realizada curva de tempo com a Rip.IV na dose de 50mg/kg, onde observou-se que os efeitos da Rip.IV apareceram após 30 minutos e persistiram até 240 minutos. A Rip.IV (25 e 50 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir de forma significativa hipernocicepção induzida por carragenina e PGE<sub>2</sub>, porém não apresentou efeito estatisticamente significativo no teste realizado com epinefrina. Na investigação do mecanismo antinociceptivo, observou-se que a Rip.IV demonstrou um efeito relacionado com a PKA, bem como com canais iônicos relacionados a essa via. Em relação à ação de Rip IV sobre os parâmetros eletrofisiológicos nos axônios do nervo ciático, observou-se um bloqueio da amplitude positiva da amplitude de primeira e segunda componentes do potencial de ação composto (CAP) de forma concentração dependente, sendo os efeitos revertidos após a lavagem. A velocidade de ambas as componentes também foi reduzida de forma semelhante. Os resultados demonstram que a Rip IV apresenta efeito antinociceptivo relacionado com uma inibição da atividade elétrica do sistema nervoso periférico.

**Palavras-chave:** *Nocicepção. Via da PKA. Potencial de ação composto.*

## ABSTRACT

### ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF RIPARIN IV IN ANIMAL MODELS: MECHANISMS INVOLVED

From the green fruit of *Aniba riparia* (Nees) Mez, some alkaloids with interesting therapeutic potential, named Riparinas, are found. Through a process of chemical modification, a structural analogue of these substances, Riparina IV, was synthesized. Previous studies have shown that it has anxiolytic and antidepressant effects, as well as antinociceptive effect. The present work was developed with the approval of CEUA / UFC (n° 06/16), with the objective of evaluating the role of Rip.IV in the process of nociception and the pharmacological mechanisms related to its activity. Initially, male Swiss mice were used and experimental models of nociception were performed: acetic acid induced contortions, mechanical hypernociception induced by algic agents (PGE2 and epinephrine), nociception test induced by intraplantar injection of capsaicin, cinnamaldehyde, menthol, acidic saline, PMA And 8-Br-cAMP. In addition to the behavioral tests, the effect of Rip.IV on the Composite Action Potential (PAC) on the sciatic nerve of Wistar rats was analyzed. We performed a time curve with Rip.IV at a dose of 50mg / kg in the test of abdominal contortions induced by acetic acid, where it was observed that the effects of Rip.IV appeared after 30 minutes and persisted up to 240 minutes. Rip.IV (25 and 50 mg / kg, v.o.) was able to significantly reduce carragennan and PGE2-induced hypernociception, but did not present a statistically significant effect on the test performed with epinephrine. In the investigation of the antinociceptive mechanism, it was observed that Rip.IV demonstrated a PKA-related effect, as well as with ion channels related to this pathway. Rip IV blocked the positive amplitude of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> CAP in a concentration-dependent way, and these effects were reversible after washout. Both components reduced the conduction velocity of CAP similarly. The results demonstrate that Rip IV presents an antinociceptive effect related to inhibition of electric activity of peripheral nervous system.

**Keywords:** *Nociception. PKA pathway. Compound action potential.*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral do circuito nociceptivo.....	20
Figura 2 - Neurônio nociceptivo primário. $A\alpha$ , $A\delta$ e C referem-se às fibras condutoras de estímulos, conforme descrito na tabela 1.....	21
Figura 3 - Estrutura química das Riparinas I,II,III e IV.....	35
Figura 4 - Fotomicrografia histológica de patas de camundongos.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fibras nervosas e velocidades de condução.....	23
Tabela 2 -	Receptores de potencial transitório homólogos ao TRPV1.....	27
Tabela 3 -	Substâncias usadas no estudo.....	38
Tabela 4 -	Escore do efeito da Rip.IV na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, em relação à presença de infiltrado inflamatório.....	49
Tabela 5 -	Escore do efeito da Rip.IV na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, em relação à presença de edema.....	49
Tabela 6 -	Efeito de Rip.IV 25 e 50 mg/kg na lambadura induzida pela co-administração intraplantar de Rip.IV com capsaicina, cinamaldeído, mentol ou salina ácida em camundongos.....	53
Tabela 7 -	Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude positiva da primeira componente do PAC.....	54
Tabela 8 -	Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude positiva da segunda componente do PAC.....	54
Tabela 9 -	Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude pico a pico do PAC.....	55
Tabela 10 -	Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a velocidade da primeira componente do PAC.....	55
Tabela 11 -	Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a velocidade da segunda componente do PAC.....	56

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Receptores de transdução expressos por neurônios nociceptores .....	28
Quadro 2 - Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.....	29-30

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da administração de RipIV na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.....	45
Gráfico 2 - Efeito da administração de RipIV na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos, em relação à curva de tempo.....	46
Gráfico 3 - Efeito da RipIV no teste da hipernocicepção mecânica induzida por carragenina.....	47
Gráfico 4 - Efeito da Rip.IV no teste da hipernocicepção mecânica induzida por PGE <sub>2</sub> .....	50
Gráfico 5 - Efeito da Rip.IV no teste da hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina.....	50
Gráfico 6 - Efeito da Rip.IV na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA.....	51
Gráfico 7 - Efeito da RipIV na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP.....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
µg	Micrograma
5-HT	Serotonina
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
AMPC	Adenosina 3´5´monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ASICs	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ASIC 1	Canais iônicos sensíveis ao ácido tipo 1
ASIC 4	Canais iônicos sensíveis ao ácido tipo 4
BK	Bradicinina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CFA	Complexo adjuvante de Freund
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DZP	Diazepam
E.P.M.	Erro Padrão da Média
ex.	Exemplo
GDNF	Fator neurotrófico de células gliais
Gs	Proteína G estimulatória
HE	Hematoxilina Eosina
Il	Interleucina

IP3	Fosfato de inositol
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
K+	Potássio
mg/kg	Miligramas por quilo
mGlu5	Receptor metabotrópico de glutamato 5
mM	Milimolar
mV	Milivolt
Na+	Sódio
Nav	Canais de sódio dependentes de voltagem
NC	Nervo ciático
NGF	Fator de crescimento neural
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
PA	Potencial de ação
PAC	Potencial de ação composto
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina tipo E2
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina tipo F2
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMA	Formol 12 miristato 13-acetato
RipIV	Riparina IV

RPM	Rotações por minuto
s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P
SMT	Trato espinomesencefálico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
STT	Trato espinotalâmico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
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
TTX	Tetrodotoxina
VLF	Funículo ventrolateral
VR1	Receptor vanilóide tipo 1
v.o.	Via oral
VR1	Receptor do tipo vanilóide 1
Vs.	Versus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Dor .....</b>	<b>16</b>
<i>1.1.1 Classificação dos tipos de dor .....</i>	<i>18</i>
<i>1.1.2 Caminhos da dor .....</i>	<i>19</i>
<i>1.1.3. Receptores envolvidos na transdução da nocicepção .....</i>	<i>25</i>
<i>1.1.4 Mediadores químicos e nocicepção .....</i>	<i>29</i>
<b>1.2 Potencial de ação e potencial de ação composto.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3 A importância dos produtos naturais na síntese de novas moléculas .....</b>	<b>32</b>
<b>1.4 <i>Aniba riparia</i> e as Riparinas .....</b>	<b>33</b>
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>37</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Animais .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Drogas e substâncias utilizadas .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Princípios éticos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Curva de dose-resposta .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5 Time course .....</b>	<b>39</b>
<b>4.6 Hipernocicepção mecânica induzida por carragenina .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7 Análise da lesão provocada por carragenina .....</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Hipernocicepção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina .....</b>	<b>41</b>
<b>4.10 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.11 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP.....</b>	<b>41</b>
<b>4.12 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina .....</b>	<b>42</b>
<b>4.13 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído .....</b>	<b>42</b>
<b>4.14 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol .....</b>	<b>42</b>
<b>4.15 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida.....</b>	<b>43</b>
<b>4.16 Registro extracelular .....</b>	<b>43</b>
<b>4.17 Análise estatística .....</b>	<b>44</b>



<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Curva de dose-resposta .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Time Course .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Hipernociceção mecânica induzida por carragenina .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Análise Histológica.....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Hipernociceção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> .....</b>	<b>49</b>
<b>5.6 Hipernociceção mecânica induzida por epinefrina .....</b>	<b>50</b>
<b>5.7 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP ou PMA .....</b>	<b>51</b>
<b>5.8 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído, mentol     ou salina ácida .....</b>	<b>52</b>
<b>5.9 Análises de parâmetros do extracelular.....</b>	<b>53</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor

A dor é algo que aflige o homem desde os tempos mais remotos, e muitos buscaram esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados ao seu controle. Dessa forma, está ligada à humanidade desde seus primórdios, e permanece como uma grande preocupação para a sociedade (SBED, 2016).

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 álgico, aspectos sensoriais, afetivos e sócio-culturais estão imbricados de modo indissociável (MELKACK; WALL, 1991; PIMENTA; PORTINOI, 1999).

A dor é sempre subjetiva, onde cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas com lesões no início da vida. Porém, a percepção corporal da dor é denominada nocicepção, termo fisiológico usado para descrever o processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008).

A nocicepção resulta da ativação de populações específicas de neurônios que transmitem as informações de um estímulo nocivo da periferia para as vias centrais (MILLAN, 1999; JULIUS; BAUSBAUM, 2001). As terminações livres, denominadas nociceptores, são ativadas por estímulos de alto limiar e múltiplas naturezas (térmica, química, mecânica), e conduzem tais estímulos de forma que os mesmos possam ser processados, e que respostas motoras sejam efetivadas (MENSE, 2009).

Dados os aspectos subjetivo e emocional da dor, o estudo desse fenômeno é considerado de extrema complexidade, ficando o método científico restrito à observação de parâmetros eletrofisiológicos, fisiopatológicos e comportamentais sugestivos de sensação dolorosa, sendo a unidade de observação, na maioria das vezes, um roedor (BENTLEY;

NEWTON; STARR, 1983; ZANBOORI; TAMADDONFARD; MOJTAHEDEIN, 2008; CHO *et al.*, 2012)

A avaliação da nocicepção em modelos animais de comportamento demonstra-se como uma ferramenta importante na compreensão dos fenômenos álgicos. A observação de comportamentos estereotipados clássicos após a estimulação nociceptiva é de grande valia na avaliação de novos compostos com potencial analgésico, bem como no estudo dos mecanismos envolvidos na transmissão e processamento das informações nociceptivas (TJOLSEN; HOLE, 1997; MARCADANTE, 1999).

Historicamente, acreditava-se que os animais não sentiam dor como os seres humanos ou que a percebiam de forma diferente. Atualmente existe uma melhor compreensão sobre o desenvolvimento e a perpetuação da dor e evidências de que animais e os seres humanos possuem vias nervosas e neurotransmissores semelhantes para o seu desenvolvimento, condução e modulação, tornando extremamente aceitável a ideia de que homens e animais experimentem a dor de forma similar (HELLYER *et al.*, 2007).

A dor pode ser gerada pelo excesso de estímulos nociceptivos, pela diminuição do limiar de disparo sensitivo ou pela hipoatividade do sistema supressor. Nas condições normais, a divisão aferente do sistema nervoso periférico (SNP) capta estímulo sensorial e transmite para o Sistema Nervoso Central (SNC), onde é decodificada e interpretada. Mecanismos modulatórios sensibilizam ou suprimem a nocicepção em todas as etapas em que ela é processada (MILLAN, 1999; STANFIELD, 2013).

A elevada prevalência das síndromes dolorosas é algo que ainda provoca uma drástica mudança na qualidade de vida de boa parte da população mundial; no Brasil, estima-se que cerca de 30% da população se queixa ou sofre de dor, no entanto esses dados podem refletir apenas parcialmente a realidade da população, visto que não há estudos epidemiológicos que englobem todas as regiões do país. Associado a isso, as estratégias terapêuticas utilizadas para tratamento e controle dos diversos tipos de manifestação da dor são consideradas limitadas do ponto de vista de melhora dos sintomas e também do custo-benefício em relação à grande quantidade de efeitos adversos relatados (HOSKIN; HANKS, 1991; SAWYNOK, 2003; SBED, 2015).

O tratamento convencional com medicamentos para o controle da dor apresenta baixa eficácia e muitos efeitos colaterais, o que acaba afetando negativamente a qualidade de vida dos pacientes, resultando na sua interrupção (ATTALA *et al.*, 2010).

### ***1.1.1 Classificação dos tipos de dor***

A dor é um fenômeno multidimensional, complexo e que apresenta diversas formas de classificação. Em relação à fisiopatologia, distinguem-se: dor nociceptiva, neuropática e psicogênica. Cada tipo de dor possui características clínicas e epidemiológicas distintas, porém observa-se que cerca de 50 a 60% dos indivíduos que apresentam condições dolorosas tornam-se parcial ou totalmente incapacitados para exercer suas atividades, de maneira transitória ou permanente, fato que contribui de forma negativa na qualidade de vida dos mesmos (SBED, 2005).

A dor nociceptiva relaciona-se com a presença de um estímulo nocivo intenso o suficiente para promover a excitação de terminações nervosas denominadas nociceptores, e 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 e a delimitação temporal-espacial é precisa (PIMENTA, 1999).

O início da dor aguda está relacionado com uma lesão ou injúria, onde há síntese e liberação de substâncias algógenas; essas, por sua vez, estimulam terminações nervosas de fibras mielinizadas finas ou amielínicas. A perspectiva de evolução natural da dor aguda é alcançar a remissão do processo, porém, em decorrência da ativação de várias vias neuronais de modo prolongado, o caráter da dor pode se modificar e haver um processo de evolução para dor crônica (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012).

Considerada como um fenômeno mundial, a dor aguda pode advir desde situações como cirurgias eletivas e de emergência, doenças graves, trauma do parto, queimaduras, até desastres em massa, calamidades naturais e tortura. Estudos apontam que esse processo pode gerar repercussões fisiológicas diversas, dentre elas: taquicardia, arritmias, diminuição da saturação de oxigênio e da oferta de oxigênio aos tecidos, agitação, sudorese, aumento do trabalho cardíaco, aumento da pressão arterial, risco de sangramento, aumento da contração muscular, ansiedade e medo (DRUMOND, 2000; TEIXEIRA; TEIXEIRA; KRAYCHETE, 2003; BRENNAN *et al.*, 2007).

A dor aguda ou fisiológica é um alerta fundamental para a preservação da integridade dos tecidos em animais, evitando ou diminuindo a extensão da ocorrência de lesões, a dor crônica não tem este valor biológico e é uma importante causa de incapacidade física (TEIXEIRA, 1990).

Dor crônica é aquela que não desaparece após a cura da lesão ou que está relacionada a processos patológicos crônicos. 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).

A dor neuropática é classificada como aquela que é induzida por lesão ou doença que afeta diretamente o sistema somatossensorial. Sua apresentação clínica envolve sinais e sintomas específicos, que a diferenciam os outros tipos de dor, tais como: persistência dos sintomas positivos além do período de cicatrização ou cura, presença de sintomas sensoriais sensitivos (hiperestesia, parestesia, disestesia, alodínea, hipoestesia ou anestesia) e presença em graus variáveis de outros sinais e sintomas neurológicos motores e autonômicos manifestados por fenômenos positivos e negativos (BACKONJA, 2003; TREEDE *et al.*, 2008).

O limiar de percepção à dor é bastante semelhante entre os indivíduos, porém 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).

Embora considerada como 5º sinal vital, portanto, de suma importância na avaliação de pacientes, observa-se que muitos profissionais de saúde convivem de forma passiva e cotidiana com a dor do outro, resultando na subidentificação e subtratamento das síndromes dolorosas (LEÃO; CHAVES, 2007).

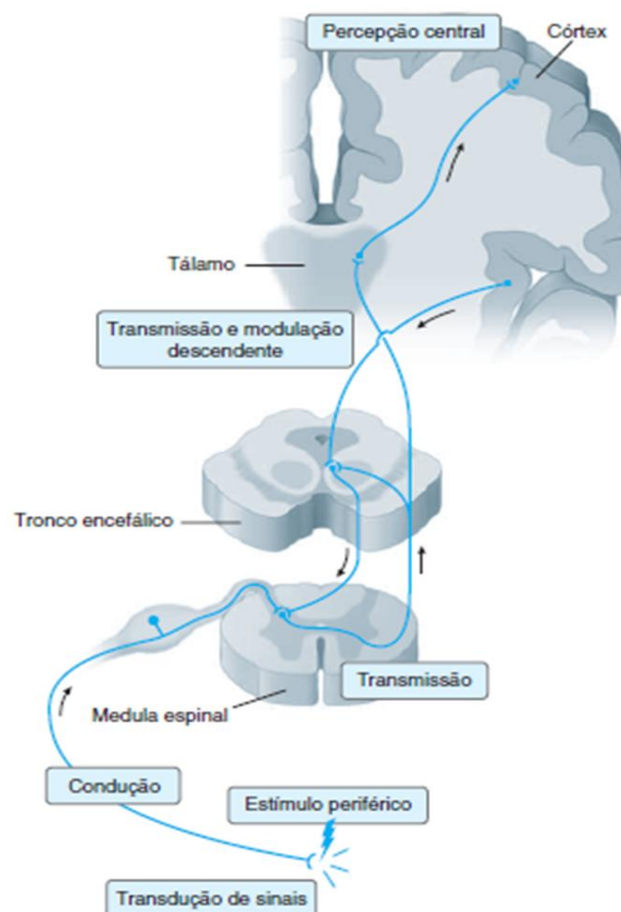
### ***1.1.2 Caminhos da dor***

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, e 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 (PORTO, 2004; TRANQUILLI, 2004).

Basbaum e Jessel (2000) descreveram a via nociceptiva de forma simplificada, envolvendo uma cadeia de três neurônios. Os neurônios de primeira ordem ou aferentes primários são responsáveis pela transdução do estímulo e condução do sinal do tecido periférico a neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal, chamados de neurônio de segunda ordem ou neurônios de projeção; esses, por sua vez, ascendem à medula espinhal e projetam os sinais em neurônios localizados no bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo e o hipotálamo. Os últimos são denominados neurônios de terceira ou supra-espinhais e projetam os sinais para áreas subcorticais e corticais, onde a dor é finalmente percebida. (Figura 1)

**Figura 1 - Visão geral do circuito nociceptivo.**



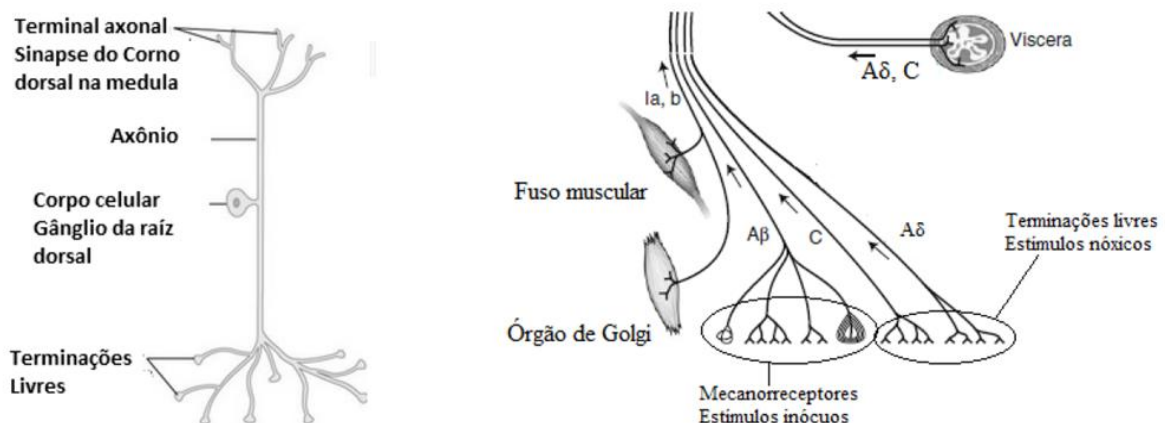
A ativação da terminação nervosa periférica por um estímulo nocivo leva à geração de potenciais de ação que são conduzidos até o corno dorsal da medula espinhal. A neurotransmissão no corno dorsal transmite o sinal a neurônios do sistema nervoso central, que enviam o sinal ao cérebro. Esse circuito também está sujeito a controle modulador descendente. Fonte: Golan, 2014.

Para que haja propagação da dor, faz-se necessário, inicialmente, ativar os nociceptores, que correspondem a terminações nervosas livres e representam a parte mais distal de um neurônio aferente, sendo amplamente encontrados na pele, músculos, mucosas, tendões, tecido conectivo de órgãos viscerais, fâscias profundas, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo e veias arteriais (HUNT; MANYTH, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Portanto, compreende-se como transdução um processo de transformação de estímulos nocivos em potenciais de ação do receptor, que são propagados pelas fibras nervosas (A $\delta$  e C, principalmente).

Dentre os receptores sensoriais, os nociceptores apresentam características que os distinguem dos demais neurônios; anatomicamente, têm um corpo celular com um axônio periférico e terminal (final) que responde a estímulos, e um ramo central que transporta a informação para o sistema nervoso central, além disso são os únicos capazes de realizar adaptações a ativações repetidas de estímulos supralimiares, promovendo redução do seu limiar de ativação. Isso resulta em uma resposta aumentada para estímulos subsequentes, fenômeno conhecido como sensibilização (PASCOE, 1997).

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. Diversos autores descreveram as características dessas fibras aferentes primárias, e o estudo sobre as distinções dessas populações de neurônios faz-se de extrema importância para o conhecimento dos fenômenos algícos (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

**Figura 2 - Neurônio nociceptivo primário. A $\beta$ , A $\delta$  e C referem-se às fibras condutoras de estímulos, conforme descrito na tabela 1.**



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.

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.

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 se tratam 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). 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). As fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao sistema nervoso central são demonstradas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Fibras Nervosas e Velocidades de Condução.**

FIBRA AFERENTE	VELOCIDADE DIÂMETRO	LOCALIZAÇÃO	ESTÍMULO
<b>Grupo II - A<math>\beta</math></b>	25-70 m.s 10 $\mu$ m	Pele, articulações, músculos.	Toque, pressão, vibração. (Inócuo)
<b>Grupo III - A<math>\delta</math></b>	2-25 m.s 2-6 $\mu$ m	Pele, articulações, músculos, discos intervertebrais, ossos.	Estímulos nocivos. (Lesivo)
<b>Grupo IV - C</b>	< 2 m.s 0,4 - 1,2 $\mu$ m	Pele, articulações, músculos, discos intervertebrais, ossos.	Estímulos nocivos. (Lesivo)

Fonte: Julius & Basbaum (2001) e Sluka (2009).

Após a deflagração do estímulo, canais de sódio são responsáveis pela despolarização da membrana e condução do impulso nociceptivo em fibras aferentes nociceptivas e não nociceptivas. As fibras aferentes nociceptivas A $\delta$  e C possuem canais de sódio tetrodotoxina resistente (TTX-resistente) e são alvos potenciais de intervenções terapêuticas, diferentemente das encontradas em fibras não nociceptivas, que são sensíveis a tetrodotoxina (TTX-sensível) (MUIR; WOOLF, 2001).

Após a transdução do estímulo e transmissão dos sinais elétricos ao sistema nervoso central, é no corno dorsal ou posterior da medula onde ocorre a integração inicial e a modulação da entrada do estímulo nociceptivo. Os neurônios de primeira ordem realizam sinapse com os de segunda ordem - predominantemente na região da lâmina II (substância gelatinosa) - e propagam a mensagem nociceptiva (ALMEIDA *et al.*, 2009).

No corno dorsal, a comunicação de informações entre vários neurônios nociceptivos ocorre através de sinalização química mediada por aminoácidos e neuropeptídeos excitatórios e inibitórios que são produzidos, armazenados e lançado nos terminais de fibras nervosas aferentes e neurônios do corno dorsal (JESSELL; KELLY, 1991). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que os aminoácidos glutamato e aspartato atuam como neurotransmissores excitatórios e evocam potenciais de ação nos neurônios do corno dorsal superficial, facilitando a transmissão nociceptiva (CROSS, 1994). Os neurônios aferentes nociceptivos, em particular as fibras C, também liberam uma variedade de outros neuropeptídeos incluindo a substância P (SP), neurotensina, peptídeo intestinal vasoativo e colecistocinina, que são capazes de provocar potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos em neurônios de projeção ascendente (SORKIN; CARLTON, 1997).

Os neurônios de segunda ordem, então, cruzam a medula espinhal e ascendem ao trato espinotalâmico (STT), onde projetam as suas fibras terminais, especialmente no tálamo. O STT é a via mais comumente relacionada à dor, sendo descritas três formas de aferências no mesmo: 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; ROZENBLATT; TUFIK, 2004; RENN; DORSEY, 2005).

No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios para diversas regiões, caracterizando diferentes vias ascendentes (RUSSO; BROSE, 1998; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

A transmissão de impulsos para o córtex cerebral apresenta-se como etapa fundamental na integração da percepção da dor. Embora as diferenças funcionais e estruturais entre as espécies sejam mais significativas do que em outros pontos da via nociceptiva, parece claro que ele é capaz de modular tanto o aspecto cognitivo quanto o aversivo da dor, bem como a características afetivas da sensação de dor, mediando complexos padrões de comportamento (LAMONT; TRANQUILLI; KURT, 2000).

A resposta sensorial aos estímulos nociceptivos é considerada um processo intensamente modulado através de diversas vias, tanto ascendentes quanto descendentes, capazes de inibir ou facilitar a condução de estímulos nócicos. A inibição descendente pode ocorrer 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).

Postulada por Melzack e Wall em 1965, e conhecida como a teoria do controle do portão, essa hipótese é uma das mais aceitas quando se trata da modulação de respostas nociceptivas. 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. Esse 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).

### ***1.1.3. Receptores envolvidos na transdução da nocicepção***

Nas últimas décadas, muitas estruturas de transdução da nocicepção foram identificadas; atualmente, classificam-se os nociceptores como mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2017).

Os nociceptores mecânicos respondem à pressão intensa enquanto os térmicos respondem às temperaturas extremas, quentes ( $> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ou frias ( $< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); já os nociceptores polimodais respondem tanto a estímulos nocivos mecânicos, quanto térmicos ou químicos, e os silenciosos são ativados por estímulos químicos, mecânicos, térmicos e mediadores inflamatórios somente estimulados por uma ameaça em potencial ao organismo humano (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os receptores de potencial transitório (TRP) constituem uma das maiores famílias de canais iônicos, sendo considerados como um dos principais grupos de detectores de estímulos nocivos (BAGGIO, 2010). Esses receptores são moléculas acopladas a canais iônicos permeáveis a cátions, e são classificados como polimodais, participando na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007).

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, excesso de prótons, que provocam modificações de pH abaixo de 6,5, e ligantes específicos (ex. Capsaicina). São expressos em nociceptores e medeiam dor aguda e crônica. Apresentam 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 insensíveis à capsaicina, sendo ativados por diferentes substâncias, e apresentam variadas temperaturas de ativação (Tabela 2)

Tabela 2 - Receptores de potencial transitório homólogos ao TRPV1

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

Fonte: FEIN, 2011.

Similar ao receptor 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), já o receptor 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.

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).

Além desses, os mecanorreceptores também participam do processo do processo nociceptivo, sendo distribuídos nas diversas camadas da pele, e respondendo a diferentes tipos de estímulo. Os discos de Merkel e corpúsculos de Meissner são encontrados nas camadas mais superficiais da pele, próximo à epiderme, enquanto receptores de folículos pilosos (encontrados na pele com pelos), corpúsculos de Pacini, terminações de Ruffini e corpúsculos de Meissner (todos encontrados somente em pele glabra) estão localizados mais profundamente, na derme, ou camada interna da pele (CRAIG, 2003). (Quadro 1)

**Quadro 1 - Receptores de transdução expressos por neurônios nociceptores**

Classe de receptor	Tipo	Tipo aferente associado	Localização	Tamanho do campo receptivo	Adaptação	Modalidade
Mecanorreceptores	Terminação nervosa livre	A-delta, C	Superficial, toda a pele	Pequeno	Lenta	Toque leve
	Disco de Merkel	A-beta	Superficial, toda a pele	Pequeno	Lenta	Pressão
	Corpúsculo de Pacini	A-beta	Profunda, toda a pele	Grande	Rápida	Vibração próxima a 300 Hz
	Corpúsculo de Meissner	A-beta	Superficial, pele glabra	Pequeno	Rápida	Vibração próxima a 50 Hz
	Receptor no folículo piloso	A-beta	Superficial, pele pilosa	Pequeno	Rápida	Encurvamento do pelo
Termorreceptores	Terminação de Ruffini	A-beta	Profunda, pele pilosa	Grande	Lenta	Pressão
	Receptores de calor (terminações nervosas livres)	C	Superficial, toda a pele	Pequeno	Rápida	Aumento da temperatura da pele
	Receptores de frio	A-delta	Superficial, toda a pele	Pequeno	Rápida	Diminuição da temperatura da pele
Nociceptores	Mecânicos (terminações nervosas livres)	A-delta	Superficial, toda a pele	Grande	Lenta	Estímulos mecânicos intensos
	Térmicos (terminações nervosas livres)	A-delta	Superficial, toda a pele	Pequeno	Rápida	Estímulo quente ou frio intenso
	Polimodais (terminações nervosas livres)	C	Superficial, toda a pele	Grande	Lenta	Estímulo mecânico ou térmico intenso; substâncias químicas específicas

Fonte: STANFIELD, 2013.

### 1.1.4 Mediadores químicos e nocicepção

Os mediadores químicos estimulam os nociceptores quimiossensíveis e agem através de dois mecanismos, 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).

Mediadores químicos como glutamato, serotonina, ATP, prótons, adenosina, dentre outros, liberados frente a uma lesão tecidual, podem atuar diretamente em canais iônicos no interior da célula, fato que promove a deflagração do potencial de ação (JULIUS; BASBAUM, 2001; GRUNDY, 2002).

Porém, outros mediadores, tais como a bradicinina (BK), substância P (SP) e as prostaglandinas (PGs), não atuam diretamente em canais iônicos, e sim em receptores de sete domínios transmembranas acoplados a proteína G, podendo causar tanto ativação, quanto sensibilização nos nociceptores (LEVITAN, 1994).

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 2.

**Quadro 2 - Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.**

MEDIADOR	EFEITO	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
<b>Óxido Nítrico (NO)</b>	Sensibilização do nociceptor	Analgesia ou hiperalgesia, dependendo da concentração	OKUDA <i>et al.</i> , 2001 DOURSOUT <i>et al.</i> , 2003 SOUSA; PRADO, 2001
<b>Bradicinina (BK)</b>	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

(Continuação)

MEDIADOR	EFEITO	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
<b>Substância P (SP)</b>	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperálgia 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
<b>Prostaglandinas (PGS)</b>	Sensibilização do nociceptor	Hiperálgia 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
<b>Citocinas pró inflamatórias e TNF-<math>\alpha</math></b>	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperálgia 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
<b>Serotonina (5-HT)</b>	Ativação e/ou sensibilização do nociceptor	Hiperálgia 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
<b>Fator de Crescimento Neural (NGF)</b>	Sensibilização do nociceptor	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	MARCHAND <i>et al</i> , 2005

Fonte: CARVALHO, 2011.

## 1.2 Potencial de ação e potencial de ação composto

As células nervosas transmitem informações entre si através de impulsos elétricos denominados potenciais de ação (PA), o que torna a comunicação dos neurônios similar a uma rede de circuitos eletrônicos. Dentre as várias formas de definir o PA, pode-se definir como uma alteração rápida do potencial de membrana, com característica tudo ou nada e com posterior retorno ao potencial de repouso da membrana (LAUGHLIN; SEJNOWSKI, 2003;



KOEPPEN; STANTON, 2009). Os PAs ocorrem a todo momento em tecidos do corpo humano, e participam da coordenação das funções orgânicas, quer no estado vigília, dormindo ou em outros estados comportamentais (SHEEBA *et al.*, 2008).

Normalmente, as células se encontram em um estado conhecido como repouso, onde os potenciais de membrana apresentam valores negativos. Essa situação é mantida principalmente por conta dos canais seletivos ao potássio, que são cerca de 100 vezes mais permeáveis que os canais seletivos ao sódio. O valor do potencial de repouso de todas as células, inclusive neurônios, apresenta-se geralmente em torno de -70 mV. (HILLE, 2001; YU; CATTERALL, 2007).

Uma das características mais significativas dos neurônios é a capacidade de alterar rapidamente seu potencial de repouso em resposta a um estímulo apropriado, sendo a resposta principal conhecida como o PA (KOEPPEN; STANTON, 2009). Em havendo a excitação da célula, ocorre uma alteração relacionada com a permeabilidade de membrana da mesma, podendo-se observar um aumento da condutância de canais de sódio e inversão de polaridade (inicialmente negativa, tornando-se positiva). A elevada condutância dos canais de sódio, por sua vez, logo cessa, e ocorre então o aumento de condutância aos canais de potássio, permitindo que o potencial de membrana retorne ao estado negativo através do efluxo de íons potássio e, em maior monta, através da inativação dos canais para sódio. (HODGKIN; HUXLEY, 1939; HODGKIN; KATZ, 1949).

Essa ativação de diferentes classes de canais iônicos resulta na formação de um potencial de ação que se propaga ao longo da célula, e é considerada a base da capacidade carreadora de sinais dos neurônios (ARMSTRONG; HILLE, 1988).

Os nervos periféricos são constituídos por diversos axônios, que apresentam diâmetros variados, sendo alguns mielinizados e outros não. Em virtude disso, observa-se uma variação quanto às velocidades de propagação dos potenciais de ação, e o registro do nervo revela uma série de picos que variam com o tempo (representando a velocidade de condução de conjuntos de axônios) e a amplitude do pico (representando o número de axônios em cada grupo de velocidades), sendo o resultado denominado de potencial de ação composto (PAC). (KOEPPEN; STANTON, 2009).

O PAC é considerado como a soma algébrica de diversos potenciais de ação, e resulta da estimulação de axônios presentes nas fibras nervosas. Inicialmente, foi descrito como a soma da atividade elétrica das fibras mielínicas de alta condutância (PERL, 2007).

O PAC apresenta um comportamento diferente do PA, onde sua resposta varia de acordo com a amplitude do estímulo; o PA, por sua vez, é caracterizado por respostas do tipo

“tudo ou nada”. Essa diferença se deve ao fato de que os nervos são formados por fibras que apresentam diferentes diâmetros, e essas estão distribuídas de forma aleatória. Aquelas maiores, que estão mais próximas à superfície, respondem quando os estímulos evocados são mais baixos, enquanto de menor diâmetro, localizadas mais profundamente, necessitam de estímulos de maior intensidade. Ao estimular as fibras com uma máxima intensidade, todas serão ativadas e, mesmo havendo aumento na intensidade desse estímulo, a resposta permanecerá inalterada (estímulo maximal). (HURSH, 1939; JUNGE, 1977).

Um tronco nervoso contém fibras de diferentes diâmetros e velocidades de condução, caracterizando os diferentes componentes do potencial de ação composto (PAC). O registro deste resulta de atividades simultâneas que ocorrem em um grande número de axônios com diferentes limiares de excitabilidade (AIDLEY, 1998).

Os grupos de axônios de um determinado nervo influenciam no formato do PAC. A natureza desse registro é bifásica, visto que é decorrente do registro realizado com um par de eletrodos diferencial. Conforme o PAC se propaga através do nervo, cada eletrodo registra a alteração de voltagem em relação ao outro eletrodo, resultando em fases ascendentes e descendentes (JUNGE, 1976).

O nervo ciático é constituído principalmente por fibras do tipo A, havendo a presença dos subtipos A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$  e A $\delta$ . O limiar de excitabilidade, bem como a velocidade e, possivelmente, as subpopulações de canais de sódio ativados por voltagem, apresentam diferentes características quando comparamos essas fibras (NOKES *et al.*, 1991; CATTERAL; MACKIE, 1996; JUNGE, 1976).

### **1.3 A importância dos produtos naturais na síntese de novas moléculas**

O conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos atingiu avanços significativos, porém observa-se que as estratégias terapêuticas não acompanharam a evolução do conhecimento científico, havendo uma disparidade nesse sentido. Os medicamentos utilizados para o controle da dor são os mesmos há décadas, sendo em maioria, fármacos das classes de opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que embora eficazes para a maior parte das condições dolorosas, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS *et al.*, 2006; WOODCOCK *et al.*, 2007).

Dessa forma, observa-se a necessidade de buscar outras medidas para o desenvolvimento de medicamentos no combate à dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais

encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (SILVA *et al.*, 2013)

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). O reino vegetal é considerado como o que contribui de forma mais significativa na obtenção de metabólitos secundários, sendo alguns desses com alto valor agregado, dadas suas aplicações como medicamentos (PHILLIPSON; ANDERSON, 1998).

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 e vasta capacidade de biossíntese. Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos (KINGHORN; O'NEIL, 1996; SCHMIDT *et al.*, 2008; KOEHN; CARTER, 2005).

Embora o isolamento de produtos naturais e a síntese de compostos com base nos mesmos esteja relacionada a muitas dificuldades, o que implica a necessidade de abordagens interdisciplinares integradas, pesquisas recentes indicam que a descoberta de fármacos baseada em produtos naturais estará entre as fontes mais importantes de novas drogas também no futuro (ATANASOV *et al.*, 2015; NEWMAN; CRAIG, 2016).

Ao invés de considerar os produtos naturais como distintos da síntese combinatória, torna-se mais efetivo adotar estratégias que combinem ambas 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 semissintéticas da molécula ou de métodos sintéticos (KOEHN; CARTER, 2005).

#### **1.4 *Aniba riparia* e as Riparinas**

A *Aniba riparia* (Nees) Mez é uma espécie pertencente ao grupo *Aniba*, típica da região da Amazônia, popularmente conhecida no Brasil como “louro” (MARQUES, 2001).

Essa planta apresenta folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos marrons e lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (MARQUES, 2001; VICENTINI *et al.*, 1999).

Através de seus frutos e caules persistentes, pode-se obter extratos que possuem atividade antibiótica comprovada contra microorganismos como *Candida albicans*, *Bacillus cereuhecidas*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001).

Nas cascas do caule de *Aniba riparia* 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 alcalamidas (feniletilamidas do ácido benzóico). (FERNANDES *et al.*, 1978; FRANÇA *et al.*, 1976; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987).

Algumas alcalamidas foram isoladas do fruto não maduro da planta *Aniba riparia*, como o éter metílico de N-benzoil-tiramina (riparina I), assim como alguns dos seus análogos substituídos, (O-metil)-N-2-hidróxibenzoil-tiramina (riparina II), (Ometil)- N-2,6-dihidróxibenzoil-tiramina (riparina III) e O-metil-N-(3,4,5- trimetóxibenzoil)- tiramina (Riparina IV) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987). Essas alcalamidas foram denominadas riparinas em homenagem à planta (BARBOSA FILHO *et al.*, 1997).

As alcalamidas podem ser formadas a partir da reação de feniletilaminas naturais, tais como a tiramina, com ácidos orgânicos. A tiramina é frequentemente observada como parte de conjugados que formam alcalamidas em algumas plantas, como exemplo as espécies de *Piper sancrum*, formando a N-*trans*-coumaroil-tiramina (MATA *et al.*, 2004), e *Aniba riparia* com a formação N-benzoil-tiramina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987) e análogos. Algumas dessas substâncias são consideradas compostos bioativos, apresentando atividade nas células receptoras (TORRES, CHAVES, 2001).

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).

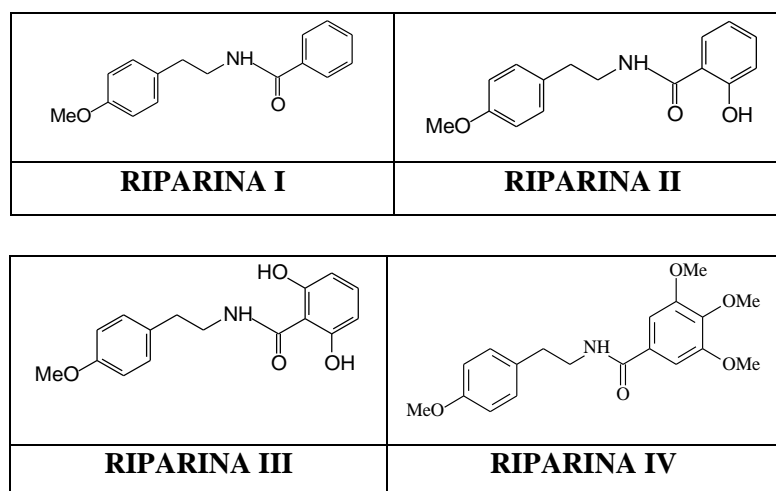
Estudos realizados no laboratório de Neurofarmacologia da UFC demonstraram que essas três substâncias também possuem efeitos sobre o sistema nervoso central, sendo esses dados publicados em diversos trabalhos. O efeito ansiolítico foi observado nos modelos de labirinto em cruz elevado e placa perfurada, sugerindo-se também um possível

envolvimento do sistema gabaérgico (SOUSA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2013).

A Riparina II apresentou uma atividade anti-inflamatória em modelos químicos da inflamação aguda (CARVALHO *et al.*, 2013), já a Riparina III apresentou uma atividade antinociceptiva periférica, interagindo com os receptores TRP e os sistemas serotoninérgico, opióide e colinérgico (VASCONCELOS, 2015).

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). Um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que a Riparina IV possui atividade antinociceptiva em modelos animais. Em outro estudo realizado por nosso grupo, essa substância também apresentou atividade ansiolítica e antidepressiva em modelos animais de comportamento agudo para ansiedade e depressão.

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



Fonte: CASTELO-BRANCO, 1992.

## **2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Em estudos recentes realizados por nosso grupo, a Riparina IV demonstrou possuir atividade antinociceptiva em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, e modelos de nocicepção induzida por algógenos (dados não publicados).

Os resultados obtidos nos testes realizados sugerem que essa droga pode apresentar-se atividade através da interação com os nociceptores, provocando uma modificação no limiar de sensibilidade da membrana, e dessa forma, agindo como uma substância antinociceptiva, porém faz-se necessário realizar outros experimentos no sentido de elucidar se a Riparina IV possui atividade antinociceptiva envolvida com receptores específicos, e quais as cascatas de ativação podem estar envolvidas nesse processo.

Os primeiros experimentos para a elucidação dessa tese de doutorado já foram realizados, porém para o desfecho da hipótese aventada, faz-se necessário complementar os experimentos e realizar outros modelos animais. A continuação do estudo da atividade antinociceptiva da Riparina IV é de fundamental importância para a elucidação de muitos questionamentos que não puderam ser solucionados através dos resultados obtidos nos testes realizados previamente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos da Riparina IV em modelos animais de nocicepção e identificar os mecanismos farmacológicos envolvidos nessa ação.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as doses efetivas e a duração do efeito antinociceptivo da Riparina IV nos testes de curva de dose e duração do efeito (“*Time course*”), respectivamente;
- Estudar o efeito antinociceptivo da Riparina IV nos modelos animais de hipernocicepção mecânica induzido por carragenina, prostaglandina E2 ou epinefrina;
- Avaliar o papel da proteína quinase C e A no efeito antinociceptivo da Riparina IV;
- Pesquisar o envolvimento de receptores de potencial transitório (TRP), receptor ASICs e bradicinina no efeito antinociceptivo da Riparina IV no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (TRPA1), mentol (TRPM8) e salina ácida (ASICs);
- Estudar as alterações eletrofisiológicas produzidas pela Riparina IV em diferentes neurônios periféricos de ratos;
- Caracterizar o efeito da Riparina IV sobre as fibras do nervo ciático de ratos registradas no PAC quantificando os seguintes parâmetros de análise: amplitude positiva dos componentes e velocidade de condução dos componentes;
- Diferenciar os tipos de fibras presentes no registro do PAC (através da velocidade de condução).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, machos adultos, pesando entre 25-32 g, e ratos Wistar machos adultos, pesando entre 150-250g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “ad libitum”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos por 4 horas antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção do fármaco.

### 4.2 Drogas e substâncias utilizadas

**Tabela 3 - Substâncias usadas no estudo.**

Substância	Origem	Doses (mg/kg)	Via
8-Br-cAMP	Sigma-Aldrich®	10 nmol/pata	i.pl.
Capsaicina	Sigma-Aldrich®	2.2 µg/pata	i.pl.
Carragenina	Sigma-Aldrich®	0,11 mg/kg	i.pl.
Cinamaldeído	Sigma-Aldrich®	10 nMol/pata	i.pl.
Indometacina	Sigma-Aldrich®	10	v.o.
PMA	Sigma-Aldrich®	500 pmol/pata	i.pl.
Mentol	Sigma-Aldrich®	1,2 µMol/pata	i.pl.
Tween 80	Sigma-Aldrich®	2 % (Veículo)	v.o.
Salina Ácida			
Formol			
Epinefrina			
PGE2			
8-Br-cAMP			
Solução de Locke			

**Fonte: autora, 2017**



### 4.3 Princípios éticos

Os experimentos foram realizados após a aprovação do projeto (Nº de protocolo: 06/16 (Anexo 1) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará e foram realizadas em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as normas éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

### 4.4 Curva de dose-resposta

Os camundongos foram divididos em 5 grupos de 8 animais, tratados por via oral com veículo (2% Tween 80 em água destilada), Rip.IV (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), usada como droga analgésica padrão. Após 60 minutos da administração de Rip.IV, 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 20 minutos, para cada animal. Uma contorção foi identificada como uma extensão das patas traseiras, acompanhada de contração do abdômen (KOSTER *et al.*, 1959).

### 4.5 Time course

Os camundongos foram divididos em 5 grupos de 8 animais, tratados por via oral com veículo (2% Tween 80 em água destilada), Rip.IV 50 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg), usada como droga analgésica padrão. Após 30, 60, 120, 240 e 360 minutos da aplicação de Rip.IV, 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 20 minutos, para cada animal. Uma contorção foi identificada como uma extensão das patas traseiras, acompanhada de contração do abdômen (KOSTER *et al.*, 1959).

#### **4.6 Hipernociceção 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 hipernociceção 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).

#### **4.7 Análise da lesão provocada por carragenina**

Os animais foram divididos em 5 grupos tratados com veículo (2% Tween 80 em água destilada), RipIV (25 ou 50 mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg, v.o.). Todos os animais receberam 20 µL de carragenina na pata direita traseira. Na 3<sup>a</sup> h após a aplicação da carragenina, as patas foram retiradas e parte delas fixadas em formol a 10% e incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos através de micrótomo (4 µm), coradas com hematoxilina-eosina e examinados a microscopia óptica. A análise histopatológica foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Gerly Anne Castro de Brito do Departamento de Morfologia da UFC. Foi quantificado edema e infiltrado em áreas representativas em aumento de 20x e 40x.

#### **4.8 Hipernociceção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub>**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via oral, e após esse tratamento, receberam uma injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> na dose de 100µl/pata, com um volume de 20 µl. Foram realizado um estímulo mecânico com o auxílio

do aparelho de Von Frey eletrônico (diâmetro de 0,8 mm), e o comportamento de resposta ao estímulo mecânico foi observado antes do tratamento com Riparina IV e nos intervalos de tempo de 30, 60 e 180 minutos após a realização dos tratamentos por via oral. A hipernocicepção foi mensurada como a diferença entre a leitura do tempo 0 e dos tempos mensurados (30, 60 e 180 minutos) (CUNHA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2011).

#### **4.9 Hipernocicepção mecânica induzida por epinefrina**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via oral, e após esse tratamento, receberam uma injeção intraplantar de epinefrina na dose de 100µl/pata, com um volume de 20 µl. Foram realizados estímulos mecânicos com o auxílio do aparelho de Von Frey eletrônico (diâmetro de 0,8 mm), e o comportamento de resposta ao estímulo mecânico foi observado antes do tratamento com Riparina IV e nos intervalos de tempo de 30, 60 e 180 minutos após a realização dos tratamentos por via oral. A hipernocicepção foi mensurada como a diferença entre a leitura do tempo 0 e dos tempos mensurados (30, 60 e 180 minutos) (CUNHA *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2011).

#### **4.10 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de PMA**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 50 mg/kg ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via oral, 60 minutos antes. Após esse período, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl de PMA (ativador de PKC – 500pmol/pata) na pata direita traseira. O tempo de lambertura da pata foi registrado, em segundos, de 0-20 min, e considerado como um índice de nocicepção (OTUKI *et al.*, 2005).

#### **4.11 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 50 mg/kg ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via oral, 60 minutos antes. Após esse período, os animais receberam uma injeção intraplantar de 20 µl de 8-Br-cAMP (ativador de PKA – 500nmol/pata) na pata direita traseira. O tempo

de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-20 min, e considerado como um índice de nocicepção. (BAGGIO *et al.*, 2012)

#### **4.12 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via intraplantar (10µl/pata), juntamente com capsaicina na dose de 2.2 µg/pata com um volume de 10µl/pata. Após a injeção intraplantar, o tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min, e considerado como um índice de nocicepção (SANTOS; CALIXTO, 1997).

#### **4.13 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via intraplantar (10µl/pata), juntamente com cinamaldeído na dose de 10 nmol/pata, com um volume de 10µl/pata. Após a injeção intraplantar, o tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min, e considerado como um índice de nocicepção (ANDRADE *et al.*, 2008).

#### **4.14 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol**

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via intraplantar (10µl/pata), juntamente com mentol na dose de 1,2 µmol/pata, com um volume de 10µl/pata. Após a injeção intraplantar, o tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-20 min, e considerado como um índice de nocicepção (ANDRADE *et al.*, 2008).

#### 4.15 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de salina ácida

Os camundongos foram divididos em grupos de 8 animais, e tratados com Riparina IV nas doses de 25 ou 50 mg/kg, ou com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada), por via intraplantar (10µl/pata), juntamente com salina ácida na dose de 2% de ácido acético em 0.9% de salina, pH 2.04/pata, com um volume de 10µl /pata. Após a injeção intraplantar, o tempo de lambadura da pata foi registrado, em segundos, de 0-20 min, e considerado como um índice de nocicepção (MEOTTI *et al.*, 2010).

#### 4.16 Registro extracelular

Ratos Wistar machos e fêmeas foram divididos em 6 grupos, sendo 3 animais por grupo. Para registro extracelular do PAC, os nervos ciáticos dos ratos foram cuidadosamente dissecados e imediatamente acondicionados em solução de Locke até o momento de sua utilização.

Em seguida, o nervo ciático foi acondicionado na câmara de registro, preenchida com 8 ml de solução de Locke e o nervo disposto horizontalmente sobre os eletrodos de platina desta câmara. Uma alça de aproximadamente 20 mm do nervo foi submersa na solução a fim de que, por capilaridade, tanto a solução quanto a Riparina IV fossem administrados ao tecido.

Uma das extremidades do nervo foi eletricamente estimulada por pares de eletrodos acoplados a um estimulador Grass, modelo S-48 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA), através de uma unidade isoladora de 34 estímulos Grass, modelo SIU 4678 (Grass Instrument Co.), e o PAC evocado foi coletado por eletrodos de registro na outra extremidade do nervo. O protocolo experimental foi realizado nas seguintes etapas:

- 1) Período de estabilização (120 min): tempo geralmente superior ao necessário para que ocorra e se comprove a estabilização (ausência de alterações na amplitude pico-a-pico) do PAC.
- 2) Período experimental (administração da droga em estudo - 60 min): foram utilizadas as concentrações de 0,1, 1, 2, 3 ou 10 mM de Riparina IV visando uma melhor caracterização do respectivo efeito sobre o nervo, e um grupo controle.
- 3) Período de lavagem (60 min): tempo no qual foi observada a recuperação dos parâmetros alterados pela droga.

Os parâmetros observados foram referentes a:

- Amplitude do Pico do potencial de ação (PAC)
- Velocidade de transmissão
- Amplitude pico a pico
- Máxima negativa

#### **4.17 Análise estatística**

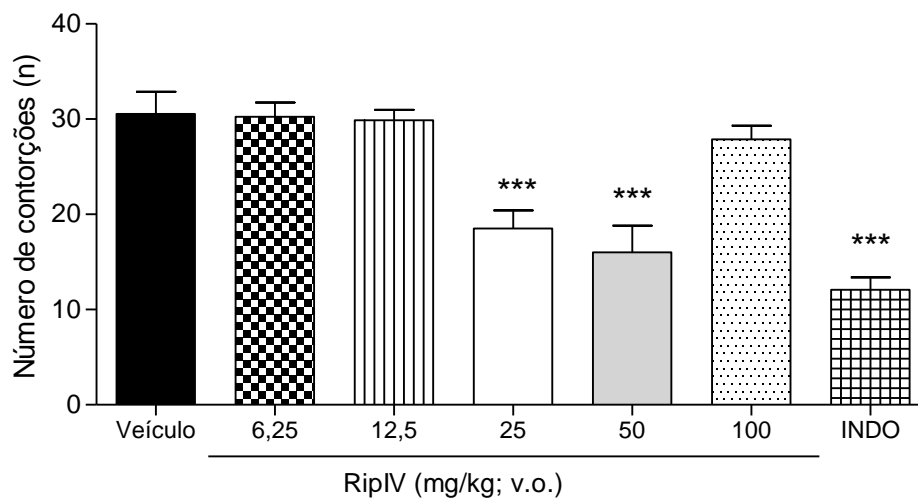
A análise estatística foi realizada por software Graphpad Prism 5.0. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. Foram utilizados análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, t-test Student e análise de variância Two- way ANOVA. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Curva de dose-resposta

Em relação à curva de doses, a Rip.IV administrada nas doses de 25 e 50 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente o número de contorções abdominais, porém as outras doses utilizadas apresentaram resultados semelhantes ao grupo de animais tratados com veículo. (RipIV-25:  $18,50 \pm 1,927$ ; RipIV-50:  $16,00 \pm 2,819$ ), quando comparado com os animais tratados apenas com o veículo ( $30,56 \pm 2,316$ ) (Gráfico 1).

**Gráfico 1 - Efeito da administração de RipIV na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.**

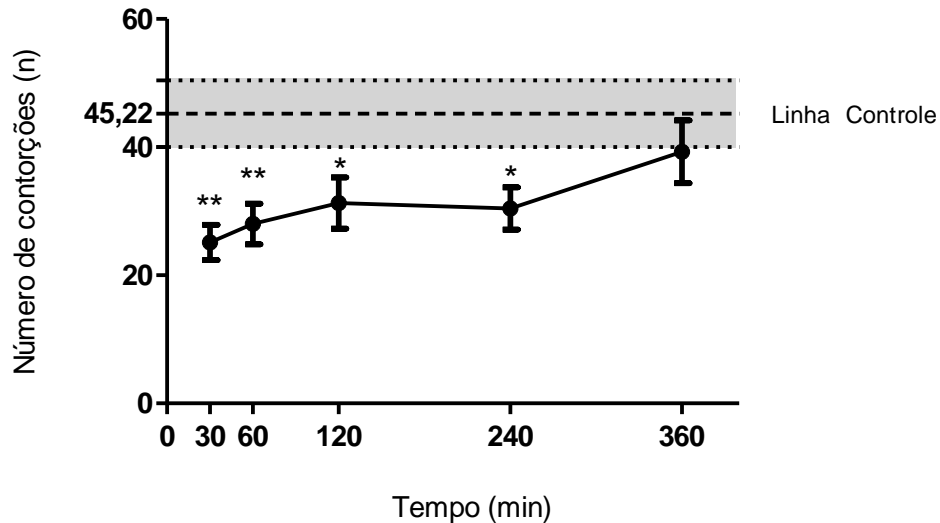


Efeito antinociceptivo da Rip.IV nas doses de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

### 5.2 Time Course

Na curva de tempo, a Rip.IV apresentou efeito antinociceptivo logo após 30 minutos da sua administração, e esse efeito se manteve por até 4 horas após a aplicação, não sendo mais significativo após 6 horas da administração da Rip.IV (Gráfico 2).

**Gráfico 2 - Efeito da administração de RipIV na nociceção induzida por ácido acético em camundongos, em relação à curva de tempo.**



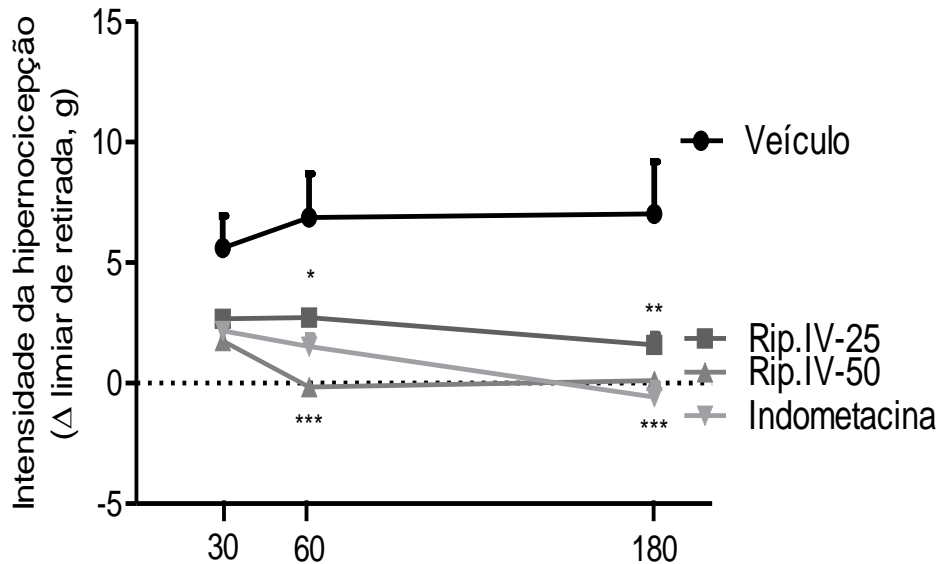
Efeito antinociceptivo da Rip.IV na dose de 50 mg/kg, nos tempos de 30, 60, 120, 240 e 360 minutos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs Veículo (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

### 5.3 Hipernociceção mecânica induzida por carragenina

No gráfico 3 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:  $1,767 \pm 0,563$ ,  $p < 0,05$ ;  $-0,167 \pm 0,372$ ,  $p < 0,001$ ;  $0,105 \pm 0,393$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 3).



**Gráfico 3 - Efeito da RipIV no teste da hipernociceção mecânica induzida por carragenina.**

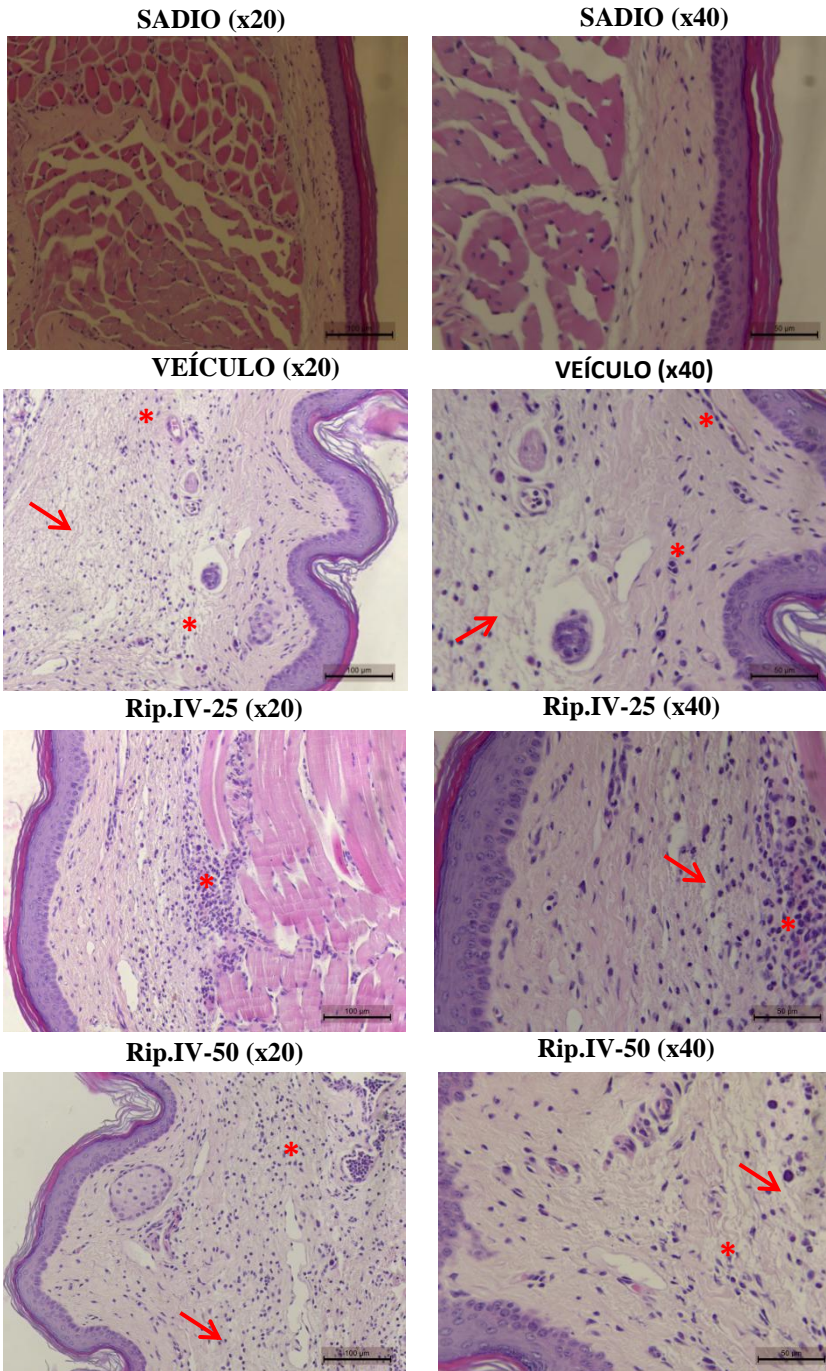


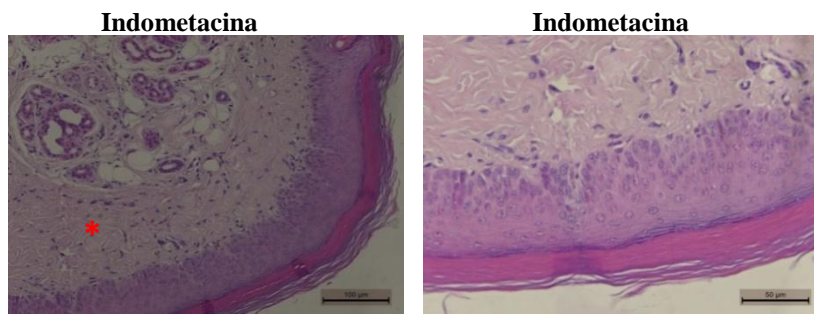
Riparina IV (25 e 50 mg/kg), Veículo (2% de Tween em água destilada) e Indometacina (10mg/kg) foram administrados 60 minutos antes, e indometacina 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina a 0,1%. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. do limiar de retirada da pata (em gramas) da 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*).

#### 5.4 Análise Histológica

Após a análise histopatológica, observou-se que a RipIV em ambas as doses apresentou escores de edema e infiltrado inflamatório semelhantes ao do grupo de animais tratado com veículo, não apresentando diferenças estatisticamente significativas. O grupo de animais tratado com indometacina apresentou uma redução significativa dos escores aferidos.

**Figura 4 - Fotomicrografia histológica de patas de camundongos.**





Animais foram tratados com RipIV (25 e 50 mg/kg), veículo, salina (sadio) e indometacina (10mg/kg). \*: infiltrado; seta: edema.

**Tabela 4 - Escores do efeito da Rip.IV na hipernociceção mecânica induzida por carragenina, em relação à presença de infiltrado inflamatório.**

Grupos	Mediana	Mínima	Máxima
Sadio	0*	0	0
Veículo	3	2	3
Indometacina	0*	0	1
Rip.IV 25	3	2	3
Rip.IV 50	3	2	3

A tabela mostra o efeito do Rip.IV nas doses de 25 e 50mg/kg quando os animais foram hipersensibilizados com carragenina e o tecido subcutâneo retirado e corado em HE. \* $p < 0,05$ . (Kruskal-Wallis e teste de Dunn, *post hoc*)

**Tabela 5 - Escores do efeito da Rip.IV na hipernociceção mecânica induzida por carragenina, em relação à presença de edema.**

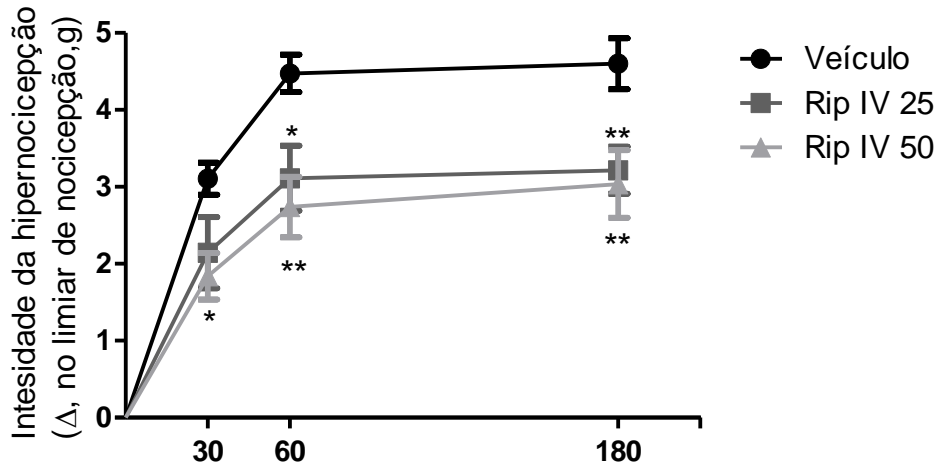
Grupos	Mediana	Mínima	Máxima
Sadio	0*	0	0
Veículo	2	2	2
Indometacina	0*	0	1
Rip.IV 25	2	2	3
Rip.IV 50	2	2	3

A tabela mostra o efeito do Rip.IV nas doses de 25 e 50mg/kg quando os animais foram hipersensibilizados com carragenina e o tecido subcutâneo retirado e corado em HE. \* $p < 0,05$ . (Kruskal-Wallis e teste de Dunn, *post hoc*)

### 5.5 Hipernociceção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub>

No protocolo de hipernociceção realizado com a administração intraplantar de PGE<sub>2</sub>, a Rip.IV na dose de 25 mg/kg mostrou efeito antihipernociceptivo estatisticamente significativo após 60 minutos de aplicação, permanecendo até os 180 minutos; já a dose de 50 mg/kg apresentou esse efeito desde o tempo de 30 minutos, permanecendo nos tempos seguintes.

**Gráfico 4 - Efeito da Rip.IV no teste da hipernociceção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub>.**

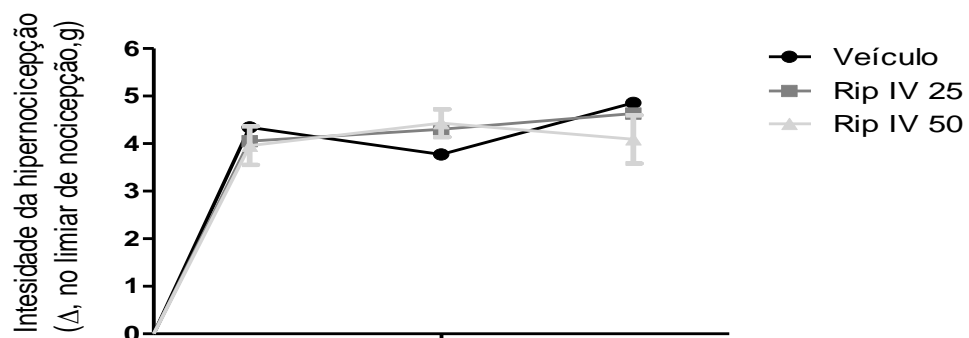


O gráfico mostra o efeito do Rip.IV nas doses de 25 e 50 mg/kg quando os animais foram hipersensibilizados com PGE<sub>2</sub>. Os pontos representam a média ± E.P.M. da intensidade do estímulo. \*p<0,05 e \*\*p<0,01 vs Veículo (Two-way ANOVA e Bonferroni, *post hoc*).

### 5.6 Hipernociceção mecânica induzida por epinefrina

No protocolo de hipernociceção realizado com a administração intraplantar de PGE<sub>2</sub>, a Rip.IV em ambas as doses não demonstrou efeito antihipernociceptivo estatisticamente significativo nos tempos aferidos, apresentando comportamento semelhante ao grupo de animais tratado com veículo.

**Gráfico 5 - Efeito da Rip.IV no teste da hipernociceção mecânica induzida por epinefrina.**



O gráfico mostra o efeito do Rip.IV nas doses de 25 e 50mg/kg quando os animais foram hipersensibilizados com epinefrina. Os pontos representam a média ± E.P.M. da intensidade do estímulo. (Two-way ANOVA e Bonferroni, *post hoc*)

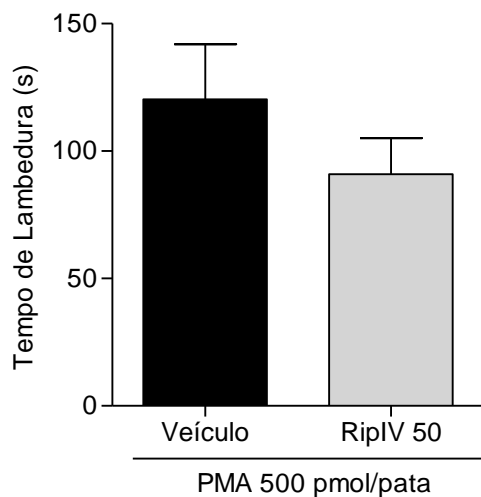
### 5.7 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP ou PMA

O tratamento realizado com Rip.IV na dose de 50 mg/kg reduziu significativamente o tempo de lambedura induzido por 8-bromo-cAMP, demonstrando um efeito inibitório máximo de 90.16% (Rip.IV-50); porém a mesma dose de Rip.IV, quando utilizada em outro grupo de animais, não foi capaz de influenciar de forma significativa o comportamento dos camundongos que receberam uma injeção intraplantar de PMA, quando comparado ao grupo tratado com veículo.

Rip.IV na dose de 50 mg/kg ( $90.89 \pm 14.23$ ) apresentou um parâmetro de tempo de lambedura induzida por PMA (ativador de PKC) semelhante ao observado nos animais tratados com o veículo ( $120.3 \pm 21.70$ ) (Gráfico 6).

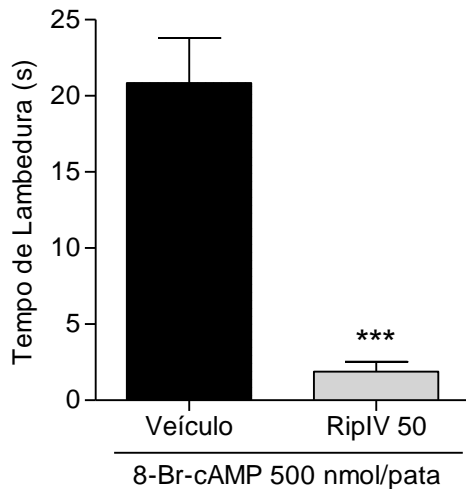
A administração de Rip.IV-50 mg/kg ( $1.87 \pm 0.66$ ) foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambedura induzida por 8-Br-AMPC (ativador de PKA) quando comparado com o veículo ( $19.00 \pm 3.10$ ) (Gráfico 7).

**Gráfico 6 - Efeito da Rip.IV na nociceção induzida pela injeção intraplantar de PMA.**



Os animais foram tratados com veículo e RipIV 50 mg/kg (v.o.) 60 minutos antes da administração de PMA. Os valores representam a média ± E.P.M. do tempo de lambedura. (T-test; Mann Whitney).

**Gráfico 7. Efeito da RipIV na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 8-Br-cAMP.**



Os animais foram tratados com veículo e RipIV 50 mg/kg (v.o.) 60 minutos antes da administração de 8-Bromo-cAMP. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do tempo de lambedura. \*\*\* $p < 0,05$  vs Veículo (T-test; Mann Whitney).

### **5.8 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, cinamaldeído, mentol ou salina ácida**

Os resultados obtidos demonstram que a co-administração de Rip.IV, em ambas as doses, com capsaicina, cinamaldeído e salina ácida foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambedura da pata dos animais, quando comparado aos animais que receberam co-administração com o veículo, porém ao observarmos o grupo de animais que recebeu Rip.IV juntamente com mentol, vimos que não houve inibição do comportamento nociceptivo.

Ao compararmos o máximo efeito inibitório da dose de 25 mg/kg de Rip.IV, observa-se que a co-administração dessa substância com capsaicina, cinamaldeído e salina ácida provocou uma redução do comportamento nociceptivo de forma semelhante (47,36%, 42,85% e 58,53%, respectivamente); já em relação à dose de 50 mg/kg de Rip.IV, é notória a diferença entre os grupos (44,12%, 79,51% e 84,26%, respectivamente).

**Tabela 6 - Efeito de Rip.IV 25 e 50 mg/kg na lambedura induzida pela co-administração intraplantar de Rip.IV com capsaicina, cinamaldeído, mentol ou salina ácida em camundongos.**

Grupos	Lambedura (s)			
	Capsaicina	Cinamaldeído	Mentol	Salina ácida
Veículo	34,00 ± 4.194	48,36 ± 6.666	31,70 ± 3,451	130,2 ± 17,81
Rip.IV – 25	17,90 ± 2.321**	27,64 ± 4,159 **	29,36 ± 4,679	54,00 ± 10,98 ***
Rip.IV – 50	19,00 ± 3.309 **	9,909 ± 2,246 ***·#	34,25 ± 4,679	20,50 ± 4,508 ***

Resultados apresentados como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 versus grupo veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test). # diferença estatística entre os grupos.

### 5.9 Análises de parâmetros do extracelular

Riparina IV apresentou efeito depressor concentração dependente sobre a amplitude positiva e velocidade dos componentes do PAC. Em relação ao parâmetro amplitude de pico das componentes do PAC, a Riparina IV apresentou resultados significativos a partir da dose de 2mM ( $p<0,05$ ) para amplitude de pico da primeira componente, e 3mM ( $p<0,05$ ) para a amplitude de pico da segunda componente. Os efeitos sobre os parâmetros do PAC avaliados foram totalmente reversíveis para as doses de 2mM e 3mM; em relação à dose de 10mM, houve uma reversão parcial em relação à amplitude do pico da primeira componente ( $p<0,05$ ) e reversão total em relação à amplitude do pico da segunda componente.

Ao final de 60 minutos de exposição do nervo à Riparina IV nas concentrações de 0,1 e 1mM ( $n=6$ ), não houve alteração significativa da amplitude positiva de ambos componentes do PAC. Na concentração de 2 mM, houve redução estatisticamente significativa apenas da amplitude positiva da primeira componente, sendo 34,7% menor em relação ao seu valor controle. Para a concentração de 3 mM ( $n=8$ ), a amplitude positiva do primeiro componente foi reduzida em 57,5% e a do segundo componente em 53,1% dos seus valores controle, e na dose de 10mM a amplitude positiva do primeiro componente foi reduzida em 85,3% e a do segundo componente em 80,4% dos seus valores controle.

Após a lavagem da Rip.IV em um tempo de observação de 60 min, houve recuperação da amplitude positiva dos componentes do PAC. Após esse período, o efeito

depressor da Rip.IV sobre a amplitude positiva dos componentes foi totalmente reversível para as concentrações de 2 e 3mM. À 10 mM de Rip.IV, a recuperação foi parcial, uma vez que o valor ao final da recuperação é significativamente diferente do valor aos 60 min em presença de Rip.IV ( $p<0,05$ ). O efeito da Rip.IV sobre a amplitude positiva e a recuperação dos componentes do PAC está sumarizado nas tabelas 7, 8 e 9.

**Tabela 7- Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude positiva da primeira componente do PAC.**

Tempo	Veículo	0,1mM	1mM	2mM	3mM	10mM
Stab	6,36 ± 0,95	3,65 ± 0,61	8,64 ± 2,27	4,12 ± 0,44	6,80 ± 1,06	7,90 ± 1,26
Droga	5,17 ± 0,90	3,53 ± 0,89	5,99 ± 1,72	2,69 ± 0,33 *	2,89 ± 0,74 *	1,03 ± 0,59 ***
Lavagem	5,17 ± 0,90	3,53 ± 0,89	7,38 ± 1,7	3,85 ± 0,14	4,70 ± 1,08	4,33 ± 0,82 #

Resultados apresentados como média ± EPM. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  vs Veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test).

**Tabela 8 - Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude positiva da segunda componente do PAC.**

Tempo	Veículo	0,1mM	1mM	2Mm	3mM	10mM
Stab	1,62 ± 0,23	0,61 ± 0,13	1,65 ± 0,44	1,39 ± 0,36	1,26 ± 0,24	2,05 ± 0,32
Droga	1,69 ± 0,21	0,49 ± 0,09	1,35 ± 0,41	1,01 ± 0,33	0,59 ± 0,12 *	0,40 ± 0,16 **
Lavagem	1,69 ± 0,21	0,49 ± 0,09	1,77 ± 0,50	1,50 ± 0,57	0,95 ± 0,15	1,64 ± 0,36

Resultados apresentados como média ± EPM. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  vs Veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test).



**Tabela 9 - Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a amplitude pico a pico do PAC.**

Tempo	Veículo	0,1mM	1mM	2mM	3mM	10mM
Stab	9,40 ± 1,28	5,39 ± 0,97	3,08 ± 0,08	6,04 ± 0,61	8,72 ± 1,45	6,05 ± 0,84
Droga	7,34 ± 1,10	5,18 ± 1,37	3,17 ± 0,10	3,77 ± 0,55*	4,14 ± 0,80**	1,26 ± 0,77***
Lavagem	7,34 ± 1,10	5,18 ± 1,37	3,10 ± 0,02	5,45 ± 0,31	6,62 ± 1,23	3,39 ± 0,52#

Resultados apresentados como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs Veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test).

Rip.IV reduziu a velocidade de condução dos componentes do PAC apenas na dose de 10mM, enquanto que nas doses de 0,1, 1, 2 e 3 mM não houve diferença estatística entre os valores. Em 10 mM (n=8), Rip.IV reduziu significativamente a velocidade de condução do primeiro e segundo componentes em 38,4% e 36,5%, respectivamente. Após a lavagem da Rip.IV um tempo de observação de 60 min, observou-se uma recuperação parcial da velocidade de transmissão positiva dos componentes do PAC (p<0,005). O efeito da Rip IV sobre a velocidade de transmissão sobre os componentes do PAC está sumarizado nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10 - Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a velocidade da primeira componente do PAC.**

Tempo	Veículo	0,1mM	1mM	2mM	3mM	10mM
Stab	71,29 ± 9,33	66,66 ± 9,27	49,64 ± 3,40	4,12 ± 0,44	54,36 ± 7,70	57,26 ± 4,66
Droga	70,92 ± 9,63	63,94 ± 9,60	44,51 ± 2,38	2,69 ± 0,33	47,42 ± 5,68	35,27 ± 1,45 **
Lavagem	70,92 ± 9,63	63,94 ± 9,60	48,91 ± 5,10	3,85 ± 0,14	54,53 ± 6,08	52,81 ± 4,73 ##

Resultados apresentados como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs Veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test).

**Tabela 11 - Efeito e recuperação de Rip.IV sobre a velocidade da segunda componente do PAC.**

Tempo	Veículo	0,1mM	1mM	2mM	3mM	10mM
Stab	22,06 ± 1,31	21,70 ± 0,83	18,27 ± 1,36	20,14 ± 0,80	19,03 ± 1,49	19,94 ± 0,86
Droga	20,97 ± 1,06	19,53 ± 1,79	15,91 ± 1,30	16,49 ± 0,30	16,41 ± 1,30	12,66 ± 0,45 ***
Lavagem	20,97 ± 1,06	19,53 ± 1,79	17,76 ± 1,97	18,74 ± 1,39	17,91 ± 1,10	16,11 ± 0,44 ##

Resultados apresentados como média ± EPM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs Veículo (one-way ANOVA seguido de Newman-Keul's test).

## 6 DISCUSSÃO

A pesquisa e as publicações na área de dor e novas drogas com potencial analgésico cresceu de forma exponencial nos últimos anos, porém apesar dos grandes esforços direcionados para a descoberta de novos alvos moleculares relacionados com os mecanismos de dor e de substâncias que ajam bloqueando ou inibindo tais alvos, ainda observamos uma ausência de avanços reais no desenvolvimento de fármacos analgésicos (KISSIN, 2010).

Portanto, estudos que objetivam elucidar a ação de novas moléculas com potencial analgésico são fundamentais no incremento de maiores recursos terapêuticos que auxiliem no manejo da dor e de seus sintomas.

Em um estudo previamente realizado por nosso grupo, demonstrou-se que a Riparina IV apresenta alterações significativas no comportamento de animais em modelos de nocicepção induzidos por estímulos químicos ou mecânicos. Os resultados obtidos indicam que essa substância apresenta uma ação provavelmente relacionada a um mecanismo periférico, não envolvendo vias do sistema nervoso central. Os testes comportamentais apresentaram, também, uma ausência de uma ação relaxante muscular da substância, excluindo-se, assim, esse viés do estudo. (Dados não publicados)

Baseado nos dados anteriormente obtidos buscou-se, então, elucidar o mecanismo de ação da Riparina IV através da realização de novos estudos comportamentais e, posteriormente, de estudo eletrofisiológico sobre a ação dessa substância sobre o potencial de ação composto em nervo ciático de ratos.

A ação antinociceptiva ou antihipernociceptiva pode se relacionar com diversos pontos da cascata de produção/liberação dos mediadores pró-inflamatórios, ou ainda sobre receptores de mediadores plasmáticos ou neurotransmissores (BEIRITH *et al.*, 2002). Baseado nisso, deu-se início a uma série de experimentos comportamentais, como objetivo de elucidar se a ação da Riparina IV poderia estar relacionada com alguma das importantes vias de nocicepção relatadas na literatura.

Foi realizada uma curva de dose-resposta, a fim de elucidar se somente as doses previamente utilizadas em estudo do nosso grupo seriam eficazes na redução do parâmetro de nocicepção observado (contorção abdominal). Os resultados obtidos confirmam que somente as doses de 25 e 50 mg/kg Riparina IV apresentam ação antinociceptiva no modelo animal utilizado para screening (contorções abdominais induzidas por ácido acético). Os grupos pré-tratados com outras doses, tanto mais baixas, quanto em dose mais elevada, não exibiram diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de contorções.

Na curva de tempo, a Riparina IV na dose de 50 mg/kg apresentou efeito antinociceptivo logo após 30 minutos da administração e esse efeito se manteve por até 4 horas após a aplicação, não sendo mais significativo após 6 horas da sua administração.

Em estudo anteriormente realizado por nosso grupo, observou-se que a Riparina IV apresentou uma ação antihipernociceptiva no modelo experimental de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina. A injeção de carragenina na pata traseira de animais gera um processo inflamatório que leva ao recrutamento de neutrófilos, e também estimula a produção de TNF-alfa, que por sua vez, induz a liberação de Il-1beta, Il-6 e Il-8. As interleucinas 1beta e 6 agem através de uma via dependente de prostaglandinas, promovendo hipernocicepção, enquanto a interleucina 8 age através da via das aminas simpatomiméticas. (CUNHA *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 1992).

A epinefrina liga-se aos receptores adrenérgicos, que são classificados em  $\alpha$  e  $\beta$ . Todas as moléculas que agem como receptores adrenérgicos são membros da família de receptores acoplados a proteína G, portanto, estão acopladas a cascatas de sinalização distais. Os receptores  $\alpha 1$  estão relacionados com a sinalização mediada por Gq, que geram IP3, que mobiliza as reservas de cálcio e DAG que ativa a PKC; já os receptores  $\beta$  ativam a proteína Gs e adenilil ciclase, promovendo aumento de AMPc (GOLAN, 2014).

Ao realizar o teste de hipernocicepção induzida por epinefrina, observou-se que o pré-tratamento com Riparina IV em ambas as doses não alterou de forma significativa o comportamento dos animais, e aqueles que receberam doses orais da substância apresentaram um limiar nociceptivo semelhante aos que receberam o veículo, demonstrando que a ação da Riparina IV não se relaciona com a via das aminas simpatomiméticas.

Contrariamente, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o pré-tratamento dos animais com Riparina IV em ambas as doses foi capaz de aumentar significativamente o limiar nociceptivo. O efeito antihipernociceptivo foi observado a partir de momentos diferentes, onde os animais pré-tratados com a maior dose de Riparina IV apresentaram aumento do limiar a partir de 30 minutos após a sensibilização com o agente nócico, enquanto os animais tratados com a menor dose somente apresentaram comportamento semelhante após 60 minutos de sensibilização com PGE2. O comportamento observado nos animais permaneceu até o fim do teste (180 minutos).

A PGE2 é uma das principais prostaglandinas pró nociceptivas liberadas na periferia em grande quantidade no local da injúria, sendo capaz de atingir seu pico em 3 horas após a administração (NAGATA *et al.*, 2005).

Devido à multiplicidade de efeitos desencadeados em animais, a prostaglandina E2 é comumente utilizada em modelos de nocicepção (Derow *et al.*, 2007). Alguns estudos demonstraram que a injeção dessa substância em humanos ou animais de experimentação é capaz de induzir tanto alodínia quanto hiperalgesia em resposta à estimulação mecânica (FERREIRA, 1972; TAIWO; LEVINE, 1991).

As ações biológicas da PGE2 são atribuídas à sua capacidade de interagir com receptores acoplados à proteína G, e então, ativar cascatas de segundos mensageiros. Esses receptores são expressos em diferentes tecidos, incluindo neurônios sensoriais (SOUTHALL; VASKO, 2001; KOBAYASHI; NARUMIYA, 2002) A ação da sensibilização da PGE2 depende principalmente da ativação de seus receptores EP e a modulação entre canais iônicos, adenilil ciclase/AMPC e ativação de PKA (NARUMIYA; FITZGERALD, 2001; BREYER *et al.*, 2001).

De acordo com o reportado na literatura, a prostaglandina E2 é capaz de ativar diversas vias nociceptivas, e a injeção intraplantar desse algógeno em ratos pode provocar hipernocicepção mecânica relacionada com o estímulo da via PKA-AmpC (ALEY; LEVINE, 1999; FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO; LEVINE, 1991). Além da ativação da PKA, a PGE2, quando injetada em patas, também é capaz de ativar outras proteínas quinases, tais como PKC e MAPK, conforme descrito por outros autores (KASSUYA *et al.*, 2007).

As proteínas quinases são moléculas sinalizadoras/efetoras de vários mecanismos diferentes, e a ativação de proteínas quinases A e C é implicada como parte de um mecanismo de nocicepção periférica, relacionado com a sensibilização de neurônios sensoriais (DRAY *et al.*, 1988; HINGTGEN *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2002)

No presente trabalho, observou-se que a Riparina IV, na dose de 50 mg/kg foi efetiva na diminuição da resposta nociceptiva à injeção intraplantar 8-bromo-cAMP, um ativador de PKA; de outra forma, o pré-tratamento com a substância não foi capaz de interferir significativamente no comportamento de lambadura da pata induzido por um agonista de PKC (PMA).

Muitos estudos demonstraram a participação das proteínas quinases em modelos de dor aguda e persistente, bem como a sua relação com mediadores inflamatórios e canais iônicos (YASHPAL *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2002; KASSUYA *et al.*, 2007; VILLARREAL *et al.*, 2009). Alguns autores propuseram mecanismos que correlaciona a liberação de neurotransmissores com a ativação da via PKA-AmpC e com os receptores TRPV1 em estágios de dor inflamatória. Segundo esses, a liberação do glutamato em resposta à inflamação e a ativação de receptores metabotrópicos (mGlu5), daria origem a uma série de

eventos que confluíam para a formação e ativação de PKA, que, por sua vez, promoveria a dessensibilização dos receptores de capsaicina (TRPV1) através da fosforilação direta (BHAVE *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2002).

A via PKA-AmpC também é relacionada com um efeito de potencialização da atividade de receptores TRPA1, através da fosforilação de quatro resíduos de aminoácidos (MEENTS *et al.*, 2017), e com alterações na transdução de sinais em receptores ASIC1 em cérebros de ratos (LEONARD *et al.*, 2002). Além dessa atividade, a proteína quinase A também pode fosforilar canais de Na<sup>+</sup>, inibir correntes de potássio, e alterar o influxo de cálcio nas fibras nervosas nociceptivas, o que provoca redução do limiar de disparo dos neurônios, aumento da excitabilidade e da liberação de neurotransmissores, como o glutamato (VANEGAS; SCHAILBE, 2001; AHMADI *et al.*, 2002).

Devido a essa ampla atividade de modulação em canais iônicos relacionada com a via PKA-AmpC, e sua aparente relação com a atividade antinociceptiva da Riparina IV, resolvemos investigar a atividade local da Riparina IV, quando administrada em conjunto com ativadores de TRPV1, TRPA1, TRPM8 ou ASICs na pata de animais. A injeção intradérmica de Riparina IV, em ambas as doses, foi capaz de inibir de forma significativa o tempo de lambadura provocado pelas substâncias capsaicina, cinamaldeído e salina ácida, relacionados com a ativação de TRPV1, TRPA1 e ASICs, respectivamente. Porém, não houve alteração estatisticamente significativa em relação ao tempo de lambadura provocado pela administração de mentol, um ativador de TRPM8.

Os receptores de potencial transiente (TRP) são classificados como receptores polimodais acoplados a canais iônicos permeáveis a cátions. Essas moléculas, portanto, participam na geração e detecção de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007; BAGGIO, 2010).

Os receptores TRP são expressos em fibras A $\delta$  e C, assim como em neurônios do gânglio da raiz dorsal. É sabido que a maioria dos neurônios que expressam TRPA1 também apresentam TRPV1; já em relação aos receptores TRPM8 observa-se uma situação contrária, onde TRPM8 é expresso no conjunto de fibras C e A $\delta$  negativas para o TRPV1 (STORY *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2006).

Os receptores TRPV1 são canais iônicos não seletivos, que apresentam elevada permeabilidade ao cálcio; quando ativados, esses receptores promovem um aumento na concentração de cálcio citosólico em neurônios sensoriais (CATERINA *et al.*, 1997). Essa permeabilidade está provavelmente relacionada à presença de um resíduo de tirosina (TM6),

que também atua em outros canais iônicos, estando relacionado com a ativação desses canais, e portanto, relacionado com a ativação das correntes iônicas (MOHAPATRA *et al.*, 2003).

O TRPA1 atua despolarizando os nociceptores frente aos estímulos nocivos que ativam vias envolvendo a fosfolipase C, PKA e receptor ativado por protease 2 (JORDT *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008). Além disso, os receptores TRPA1 são coexpressos com os canais TRPV1, e essa coexpressão reforça o envolvimento mútuo e/ou sinergia de diferentes mecanismos envolvendo os dois receptores (STORY *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

Os canais de íons sensíveis ao ácido (ASICs) representam outra família de moléculas importantes na transdução da nocicepção. Algumas evidências sugerem que ASIC e TRPV1 têm papéis complementares na detecção de prótons no neurônio sensitivo (BAGGIO *et al.*, 2012).

Além dos TRP, outros canais que participam da transdução do sinal nociceptivo são os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs). Pertencem a superfamília de canais de Na<sup>+</sup> epiteliais degenerina e são ativados por prótons extracelulares e modulado por diversos cátions e proteínas quinases (PKC e PKA), tendo sua expressão aumentada mediante alguns mediadores inflamatórios (bradicinina, serotonina e IL-1) (MAMET *et al.*, 2002).

A nocicepção é um processo que inclui diversas vias de sinalização, envolvendo tanto mecanismos centrais quanto periféricos, liberação de neurotransmissores, liberação de mediadores inflamatórios pré-formados, ou produzidos após o início do processo (CUNHA *et al.*, 1992; CUNHA *et al.*, 2005).

A fim de elucidar se a ação da Riparina IV está relacionada com uma ação antiinflamatória ou antiedematogênica, foi realizado um pré-tratamento com Riparina IV por via oral, e indução de inflamação na pata provocada por injeção de carragenina. O pré-tratamento com Riparina IV não inibiu de forma significativa a formação de edema nem a migração de células de defesa para a região tratada com carragenina. Os escores de edema e infiltrado inflamatório dos animais que receberam tratamento oral com Riparina IV foram semelhantes ao dos animais tratados com veículo; já os animais tratados com Indometacina apresentaram redução significativa de ambos os parâmetros.

Nascimento *et al.* (2016), realizaram um estudo utilizando a Riparina IV em outros modelos experimentais de nocicepção. Ao testar a atividade dessa substância em modelo de nocicepção provocada pelo CFA, os autores sugeriram que a Riparina IV apresentava um efeito antinociceptivo e antiedematogênico, sendo a última característica não observada em nosso estudo. Ainda, os autores inferem que a Riparina IV seria capaz de agir inibindo a produção de PGE2.

Essa discrepância de resultados deve-se, provavelmente, a diferenças relacionadas com a diluição da substância em Tween 80, à utilização de diferentes alógenos para indução do processo inflamatório, e ao emprego de diferentes doses nos estudos. No estudo realizado por Nascimento *et al.* (2016), foi realizada diluição em 5% do solubilizante, superior à diluição de 3% realizada para o presente estudo, e as doses da Riparina IV foram inferiores às utilizadas no presente trabalho. As doses selecionadas para o estudo aqui descrito estão de acordo com a curva de dose-resposta realizada no modelo de contorções abdominais por ácido acético, onde somente as doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram efeito significativo na redução do número de contorções mediadas por ácido acético.

Outro fato que refuta essa ação relacionada exclusivamente à produção de prostaglandinas é a rápida ação da Riparina IV quando injetada na pata de animais, produzindo efeitos observados em poucos minutos, como nos testes de nocicepção mediada por capsaicina (0-5 minutos).

Os resultados em testes comportamentais indicam que a Riparina IV apresenta uma ação antinociceptiva relacionada com um mecanismo de ação periférico.

Nociceptores são capazes de detectar estímulos nocivos relacionados à liberação de mediadores inflamatórios e realizar a transdução destes estímulos nocivos em atividade elétrica. Um potencial de ação é gerado na periferia e permite a transmissão da dor através do nervo periférico ao sistema nervoso central (SNC). Os canais  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{K}^+$  estão envolvidos neste processo e a modulação desses canais é sugerida como mecanismos de ação relacionados à hipernocicepção, diminuindo a excitabilidade do limiar do nociceptor (MILLAN, 1999; ALEY *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2000; WOOLF, 2007; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Diversos estudos demonstraram que substâncias extraídas de produtos naturais e que apresentam atividade antinociceptiva em modelos animais *in vivo* podem relacionar-se também com alterações significativas na condução ou excitabilidade neuronal (AMORIM *et al.*, 2016; LA ROCCA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2015; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2015; SILVA-ALVES *et al.*, 2015; LEAL-CARDOSO *et al.*, 2010; JOCA *et al.*, 2012). Riparina IV é um análogo estrutural das Riparinas isoladas de espécies de *Aniba riparia*, e apresenta o mesmo núcleo dessas substâncias.

Diferentes moléculas de Riparina foram testadas e apresentaram atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (ARAÚJO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015), porém não há relatos na literatura que demonstrem alguma investigação relacionando essas substâncias com



alterações de parâmetros eletrofisiológicos. Devido a essa semelhança estrutural com produtos naturais, e à atividade antinociceptiva demonstrada nos modelos animais estudados, e no sentido de investigar melhor a ação da Riparina IV sobre os neurônios periféricos, resolveu-se estudar a atividade dessa substância em preparações intactas dos neurônios de nervo ciático de ratos.

O estudo dos potenciais de ação composto em nervo ciático de ratos é uma ferramenta experimental que pode auxiliar na obtenção de maiores informações sobre fatores que influenciam na propagação dos impulsos nervosos. Uma vez que a atividade elétrica celular é caracterizada pelo fluxo de íons através da membrana neuronal, o registro extracelular de potencial de ação é capaz de detectar essa atividade sem que o eletrodo penetre na célula e a danifique (MILLAR, 1997).

O nervo ciático é constituído principalmente por fibras do tipo A, de acordo com a classificação de Erlanger e Gasser, apresentando os subtipos A $\alpha$ , A $\beta$  e A $\delta$  e fibras C. Estas fibras apresentam diferentes diâmetros, velocidades, limiares de excitabilidade e, possivelmente, populações de canais distintas (NOKES *et al.*, 1991; CATTERALL; MACKIE, 1996; JUNGE, 1977).

Ao submeter fibras nervosas do ciático a estímulos elétricos, verificam-se o surgimento de ondas, também denominadas componentes. Essas componentes refletem o comportamento do potencial de ação composto registrado em tronco nervoso; esse parâmetro difere do potencial de ação, porque apresenta uma resposta graduada, que varia de acordo com amplitude do estímulo, diferentemente do potencial de ação, que apresenta uma característica “tudo ou nada” (HURSH, 1939; JUNGE, 1977).

A avaliação de parâmetros observados no registro extracelular em ciáticos de rato demonstrou, pela primeira vez, que a Riparina IV em diferentes doses foi capaz de reduzir a amplitude do potencial de ação composto.

No estudo realizado, foram observadas duas ondas no registro do potencial de ação composto, denominados primeiro e segundo componentes. Sabe-se que os componentes do PAC são resultantes das atividades de fibras diferentes, onde o primeiro componente do relaciona-se principalmente com potenciais de ação de fibras motoras e o segundo, com potenciais de ação de fibras sensoriais (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2010).

A queda da amplitude do PAC relaciona-se com uma redução na condução nervosa nas fibras de ciático. De acordo com Hille (2001), uma redução de 50% da amplitude do potencial de ação é capaz de provocar déficit da função neural, gerando uma inibição da transmissão nervosa. A Riparina IV nas doses de 3 e 10 mM foi capaz de reduzir a amplitude

do PAC, em ambas as componentes, em mais de 50%, quando comparado aos valores controle. Na dose de 3mM, a redução das amplitudes positivas foi de 57,5% para o primeiro componente e 53,1% para o segundo; já na dose de 10mM, as amplitudes foram reduzidas em mais de 80%, sendo uma redução de 85,3% e 80,4% em primeiro e segundo componentes, respectivamente.

Além da alteração das amplitudes positivas, observou-se também uma inibição da amplitude pico a pico. Nas doses de 3 e 10 mM, a Riparina IV apresentou redução superior a 50% dos valores de amplitude pico a pico, corroborando com os resultados observados em relação às amplitudes positivas, sendo demonstrada uma redução de aproximadamente 53% na dose de 3 mM, e de aproximadamente 79% na dose de 10mM. A amplitude pico a pico refere-se à quantidade de fibras que estão sendo despolarizadas simultaneamente no momento.

A velocidade de condução é outro parâmetro comumente analisado nos estudos de eletrofisiologia, e está relacionado com diversos fatores, tais como o diâmetro da fibra nervosa, relação entre o diâmetro do axônio e da bainha de mielina, e da distância entre os nódulos de Ranvier em neurônios mielinizados (FALK; STALBERG, 1995). A relação entre diâmetro das fibras e velocidade de condução é considerada inversamente proporcional ao seu tamanho, portanto, fibras de menor diâmetro possuem velocidade de condução menor, quando comparadas às de maior diâmetro (ERLANGER; GASSER, 1937).

Quando se considera a condução nas fibras mielinizadas, tais como as observadas na análise extracelular, observa-se a característica de condução saltatória, visto que a excitabilidade dessas células localiza-se predominantemente nos nodos de Ranvier (FALK; STALBERG, 1995).

No presente estudo, foi observada uma velocidade de aproximadamente 60 m/s em relação ao primeiro componente, que caracterizaria uma ação relacionada às fibras mielinizadas A $\beta$  ( $\pm$  30-70 m/s), e o segundo componente apresentou uma velocidade de condução de aproximadamente 20 m/s, caracterizando fibras mielinizadas sensoriais do tipo A $\delta$  ( $\pm$  5-30 m/s). A Riparina IV na dose de 10 mM foi capaz de reduzir a velocidade de condução em ambos componentes, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre a redução da velocidade de primeiro e segundo componentes (38,4% e 36,5%, respectivamente).

Os impulsos nervosos de origem nociceptiva são normalmente conduzidos por fibras Adelta e C (NÄRHI *et al.*, 1982). Ao analisarmos a ação da Riparina IV sobre a velocidade de condução do segundo componente, observa-se que a redução estatisticamente

significativa desse parâmetro pode estar relacionada com a ação antinociceptiva dessa substância.

A redução na velocidade de condução pode ser provocada através da alteração de fatores como: redução das correntes de sódio, mas também pela alteração das propriedades passivas do axônio, como aumento da capacitância da membrana por unidade de área, aumento da resistência do axoplasma ou diminuição da resistência da membrana.

As correntes de sódio são responsáveis pelo pico do potencial de ação nas membranas de neurônios e da maioria das células excitáveis. Um bloqueador padrão dos canais de sódio dependentes de voltagem poderia reduzir a condutância ao Na<sup>+</sup>, e conseqüentemente, diminuir a ativação das fibras do feixe nervoso (ALVES *et al.*, 2010). Diversas substâncias, incluindo toxinas extraídas de animais, apresentam atividade de bloqueio de canais de sódio, e a maioria desses compostos age estabilizando o estado inativado dos canais de sódio (BOSMANS *et al.*, 2006; CORZO *et al.*, 2007; KLINT *et al.*, 2012)

É descrito na literatura que a redução da velocidade de depolarização está associada com um aumento do tempo de pico, fato que pode ser quantificado como uma despolarização mais lenta do PAC (CATTERALL, 2000; HILLE, 2001). Os resultados do presente estudo demonstram que a Riparina IV na dose de 10mM aumentou significativamente o tempo de pico de ambos os componentes, sendo observada uma maior atividade em relação ao tempo do segundo componente. Quando consideramos o aumento do primeiro componente, pode-se observar um aumento de aproximadamente 20% em relação ao valor controle, já quando se trata da alteração de parâmetro do segundo componente, pode-se observar um aumento de aproximadamente 34%, caracterizando uma maior atividade em fibras sensoriais, de acordo com o parâmetro analisado.

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) apresentam-se amplamente distribuídos no organismo dos mamíferos, porém alguns desses canais iônicos são encontrados exclusivamente no sistema nervoso periférico, sendo esses Nav 1.7, 1.8, e 1.9 (BHATTACHARYA; WICKENDEN; CHAPLAN, 2009).

Além dos subtipos 1.7, 1.8 e 1.9, os canais de sódio dependentes de voltagem 1.3 também são tidos como um potencial alvo terapêutico para novas drogas com capacidade analgésica. Estes subtipos são predominantemente expressos em neurônios sensoriais com ligação à nocicepção e, portanto, fornecem uma forte justificativa para o desenvolvimento de novos tratamentos para a dor. (ENGLAND; DE GROOT, 2009; NARDI *et al.*, 2012).

A importância dos inibidores do canal de sódio como uma classe de terapêutica destaca-se pela sua exploração bem-sucedida em diferentes substâncias utilizadas no mercado como anticonvulsivantes, antiarrítmicos, anestésicos locais e analgésicos (CLARE *et al.*, 2000; MANTEGAZA *et al.*, 2010).

No presente estudo, não foi realizada uma análise da atividade da Riparina IV sobre as correntes de sódio devido a fatores limitantes ao trabalho, como necessidade de conhecimento e manejo de outra técnica de registro eletrofisiológico (ex. registro intracelular), bem como disponibilidade de tempo, animais de experimentação e droga. Porém, os resultados obtidos sugerem uma provável ação dessa substância em nível de canais de sódio dependentes de voltagem.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o presente estudo constata-se que:

- O tratamento oral com RipIV foi capaz de causar uma antinocicepção no modelo de contorções induzida por ácido acético, com efeito que se inicia 30 minutos após a sua administração e dura por até 4h.
- A RipIV apresenta propriedades antihiperálgica frente a estímulos como a carragenina e PGE2.
- O tratamento com RipIV não apresenta ação antiedematogênica ou anti-inflamatória no modelo de hiperálgia por carragenina.
- O efeito antinociceptivo da RipIV parece envolver a via da PKA.
- RipIV administrada por via intraplantar apresentou um efeito antinociceptivo local que parece envolver os receptores TRPV1, TRPA1 e ASICs.
- RipIV é capaz de bloquear tanto a primeira quanto a segunda componente do PAC em NC de ratos.
- RipIV também alterou a amplitude pico a pico do PAC.
- RipIV interferiu na velocidade de condução tanto em primeira quanto em segunda componente do PAC.

## 8 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo demonstra que a Rip IV exerce um efeito antinociceptivo significativo. Tal efeito a nível periférico parece ser mediado em parte, por uma interação com a via da PKA, relacionada com nociceptores que participam do processo de transdução na nocicepção. Em relação às atividades eletrofisiológicas da substância, pode-se afirmar que a RipIV é um bloqueador do PAC, e apresenta uma atividade que sugere o envolvimento dos canais de sódio.

Diante do exposto, podemos sugerir que a RipIV constitui uma molécula interessante para o desenvolvimento de fármaco terapeuticamente útil no controle da dor aguda.

## REFERÊNCIAS

AHMADI, S. et al. PGE (2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. **Nat Neurosc**, n. 5, p. 34-40, 2002.

AIDLEY, D. J. **The Physiology of excitable cells**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 35-71.

ALEY, K.O. et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J Neurosci**. v. 20, p. 4680–4685, 2000.

ALMEIDA, R. N. et al. Rosewood Oil Induces Sedation and Inhibits Compound Action Potential in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 440-443, 2009.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v. 1000, p. 40–56, 2004.

AMORIM, Renata Morais Ferreira *et al.* The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na<sup>+</sup> currents. **Inflamm. Res.**, v. 65, p. 701–708, 2016.

ANDRADE, E. L. et al. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, p. 511 -520, 2008.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol. Adv**, v. 33, p. 1582–1614, 2005.

ATTALA, N. et al. Guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. **European Journal Neurology**, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, 2010.

BACKONJA, M. M. Defining neuropathic pain. **Anesth Analg.**, v. 97, n. 3, p.785-790, 2003.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of  $\beta$ -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **Int J Biol Macromol**, v. 50, p. 872-877, 2012.

BAGGIO, C. H. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1→3), (1→6)  $\beta$ -glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.** 2010. 120 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of severall new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, p. 332 - 334, 1990.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2615 - 2617, 1987.

BASBAUM, A.; JESSELL, T. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. **Principles of Neural Science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.

BASHIR, Z. I.; VIGNES, M. Electrophysiological recording in brain slices. In: LYNCH, M. A.; O'MARA, S. M. (Ed.). **Neuroscience LABFAX**. London: Academic Press, 1997. 291p.

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.

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

BHATTACHARYA, A.; WICKENDEN, A.D.; CHAPLAN, S.R. Sodium Channel Blockers for the Treatment of Neuropathic Pain. **Neurotherapeutics**, v. 6, p. 663–678, 2009.

BHAVE, G. et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12480-5, 2003.

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.

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.

CARVALHO, A. M. R. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, n. 3, p. 165-172, 2013.

CASTELO-BRANCO, U. V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense.**, v. 19, p. 197 - 202, 2000.



CASTELO-BRANCO, U.V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 19, p. 197-202, 2000.

CASTELO-BRANCO, V. U. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina**. 1992. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba..

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local Anesthetic. In: GOODMAAN, L. S. e GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. USA: Mcgraw-Hill Companies Inc., p. 331 - 347, 1996.

CLARE, J.J. et al. Voltagegated sodium channels as therapeutic targets. **Drug Discov Today**, v. 5, p. 506-520, 2000.

CORZO, G. et al. Solution Structure and Alanine Scan of a Spider Toxin That Affects the Activation of Mammalian Voltage-gated Sodium Channels. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 7, p. 4643–4652, 2007.

COUTAUX, A. et al. 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.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765 - 767, 1991.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumor necrosis factor a in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660 - 664, 1992.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, p. 1755 – 1760, 2005.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p.697-702, 2015.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 3, p. 99-104, 1993.

DRUMMOND, J. P. **Dor aguda: fisiopatologia clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu; 2000. Capítulo 3, Dor pós-traumática; p. 57-71.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, n. 120, v. 11, p. 3760–72, 2010.

ENGLAND, S., DE GROOT, M. J. Subtype-selective targeting of voltagegated sodium channels. **Br. J. Pharmacol.** v.158, p. 1413–1425, 2009.

ERLANGER, J.; GASSER, H. S. Electrical signs of nervous activity. **Am. J. Psychiatry**, n. 93, p.1472 – 1473, 1937.

FALK, B.; STALBERG, E. Motor nerve conduction studies: measurement principles and interpretation of findings. **J Clin Neurophysiol**, v.12, p. 254-279, 1995.

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

FIELDS, H. The psychology of pain. **Scientific American Mind**, n. 20, v. 5, p. 42–49, 2009.

FLOR, H. **New developments in the understanding and management of persistent pain**. *Curr Opin Psychiatry*, 2012.

FRANÇA, N.C. et al. Tri-O-methylgalangin from Aniba Riparia. **hytochemistry**, v. 15, p. 572, 1976.

FERREIRA-DA-SILVA, Francisco Walber et al. Effects of 1,8-cineole on Na<sup>+</sup> currents of dissociated superior cervical ganglia neurons. **Neuroscience Letters**, v. 595, p. 45–49, 2015.

BOSMANS, Frank et al. Four Novel Tarantula Toxins as Selective Modulators of Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes. **Mol Pharmacol**, v. 69, p. 419–429, 2006.

CORZO, Gerardo et al. Solution Structure and Alanine Scan of a Spider Toxin That Affects the Activation of Mammalian Voltage-gated Sodium Channels. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4643–4652, february 16, 2007.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia a Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GORDON, G.; WHITTERIDGE, D. W. Conduction-time for human pain sensation. **Lancet**, v. 245, p. 700-701, 1943.

GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. **Gut**, v. 51, p. 2-5, 2002.

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.

HILLE, B. **Ion Channels of Excitable Membranes**. 3. ed. Sanderland, USA: Ed.Sinauer, 2001.

HINGTGEN, C. M.; WAITE, K. J.; VASKO, M. R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 7, p. 5411-9. 1995.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. Action potentials recorded from insid a nerve fiber. **Nature London**, v. 144, p. 710 - 711, 1939.

HODGKIN, A. L.; KATZ, B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. **Journal of Physiology**, v. 108, p. 37 - 77, 1949.

HOSKIN, P. J.; HANKS, G.W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, n. 44, p. 326–44, 1991.

HU, H. J. et al. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **J Neurosci**, n. 22, p. 7444 –7452, 2002.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 83 – 91, 2001.

HURSH, J. B. Conduction velocity and diameter of nerve-fibers. **American Journal of Physiology**. 127:131-139, 1939.

HURSH, J. B. Conduction velocity and diameter of nerve-fibers. **American Journal of Physiology**, v. 127, n. 1, p. 131-139, 1939.

JOCA, H. C et al. Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. **J Nat Prod**, 75: 1511-1517, 2012.

JULIE, K. et al. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. **Toxicon**, v. 60, p. 478–491, 2012.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203 – 210, 2001.

JUNGE, D. **Nerve and muscle excitation**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 7 - 21, 1976.

KASSUYA, C. A. L. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid receptors and protein kinases. **Br J Pharm.**, n. 150, p. 727–737, 2007.

SILVA-ALVES, Kerly Shamyra da et al. Essential Oil of *Croton zehntneri* and Its Main Constituent Anethole Block Excitability of Rat Peripheral Nerve. **Planta Med.** 81, p. 292–297, 2015.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 493, n. 4, p. 596-606, 2005.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

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

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

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.

LEAL-CARDOSO, J. H. et al. Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na<sup>+</sup> current in dissociated dorsal root ganglia neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 645, p. 86-93, 2010.

LEÃO, E. R; CHAVES, L. P. **Dor 5º sinal vital: reflexões e intervenções de enfermagem**. São Paulo: Martinari, 2007.

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.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10662-70, 2002.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nervy 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.

MANTEGAZZA, M. et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. **Lancet Neurol.**, v. 9, n. 4, p. 413-424, apr. 2010.

MARQUES, A. D. S. et al. Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and riparin III. **Journal of Molecular Structure**, v. 753, p. 13-21, 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família lauraceae lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p.195 - 206, 2001.

MEENTS, J. E.; FISCHER, M. J. M.; MCNAUGHTON, P. A. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. **PLoS ONE** 2017; 12.

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

MENDONÇA, S. H. F.; LEÃO, E. R. Implantação e monitoramento da dor como 5º sinal vital: o desenvolvimento de um processo assistencial. In: Leão ER, Chaves LD. **Dor 5º sinal vital: reflexões e intervenções de enfermagem**. 2. ed. São Paulo: Martinari; 2007.

MENSE, S. Algesic agents exciting muscle nociceptors. **Exp Brain Res**, v. 196, p. 89-100, 2009.

MEOTTI, F. C; COELHO, I. S; SANTOS, A. R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J Pain.**, v. 11, p. 570-578, 2010.

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, v. 79, n. 1, p. 1-13, 1999.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 161-164, 1999.

MUIR, W.W.; WOOLF, C. J. Mechanisms of pain and their therapeutic implications. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 219, p. 1346–1356, 2001.

NAGATA, K. et al. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 4052-4061, 2005.

NARDI, A. et al. Advances in targeting voltage-gated sodium channels with small molecules. **Chem Med Chem**, v. 7, p.1712–1740, 2012.

NÄRHI, M.; HIRVONEN, T.J.; HAKUMÄKI, M.O. Responses of intradental nerve fibres to stimulation of dentine and pulp. **Acta Physiologica Scandinavica**. V. 115, p. 173–178, 1982.

NASCIMENTO, O. A. et al. Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation. **Molecules**, 21: 1757-1761, 2016;

NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 507-14. 2006.

NOKES, L. D. M. et al. Investigations into the analysis of the rate of decay of the compound actions potentials recorded from the rat sciatic nerve after death: Significance for the prediction of the post-mortem period. **Forensic science International**, v. 50, p. 75 – 85, 1991.

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

OTUKI, M. F. et al. Antinociceptive properties of mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmol Exp Ther.** , v. 313, p 310–318, 2005.

PASCOE, P. Local and regional anesthesia and analgesia. **Seminary in Veterinary Medicine Surgery**, v. 12, p. 94-105, 1997.

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.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nat Rev Neurosci.**, 8(1):71-80.jan. 2007.

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.

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.

ROCHA, N. F. et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, v. 384, n.6, p.525-533, 2011.

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

SANTIAGO, Renata Fortes et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice Inflammation. **New York** **38.6**, p. 2203-2215, dec. 2015.

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.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol Rev** v. 5, n. 5, p. 1–20, 2003.

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

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

SIDDALL, P. J.; COUSINS, M.J. Persistent pain as a disease entity: implications for clinical management. **Anesth Analg** v. 99, n. 2, p. 510–520, 2004.

SILVA, R.O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact.**, v. **229**, p. 55-63, mar. 2015.

SILVA, J.C. et al. Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SLUKA, K. A. **Mechanisms and management of pain for the physical therapist**. IASP Press, 2009. 394 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESTUDO SOBRE A DOR. **A dor crônica no Brasil - o que nos dizem os estudos**. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. **O que é Dor?**. 2012. Disponível em: <<http://www.dor.org.br>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

SOUZA, A. L. S. et al. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 239-47, 2002.

STANFIELD, C. L. Principles of human physiology. 5. ed. São Paulo: **Pearson**, 2013.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. **Cell**, v.112, p. 819-829, 2003.

TANG, L. et al. 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.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, W. G. J.; KRAYCHETE, D. C. Epidemiologia geral da dor. In: TEIXEIRA, M. J. et al. (orgs.). **Dor: contexto interdisciplinar**. Curitiba: Maio; 2003. p. 53-66.

TEIXEIRA, C. P. L. et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 129-137, 2013.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, Stephen A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 399-402p.

TREEDE, R. D. et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology.**, v. 70, n. 18, p.1630-1635, 2008.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog in Neurobiol.** 2001;64:327-363.

VASCONCELOS, L. F. **Efeito antinociceptivo da Riparina III (n-2,6-dihidroxi benzoil o-metil-tiramina) em camundongos: possíveis mecanismos farmacológicos**. 2015. 97f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

VENANCIO, A. M. et AL. Essential Oil of *Ocimum basilicum* L. and (-)-Linalool Blocks the Excitability of Rat Sciatic Nerve. **Evid B Compl Alter Med.**, p. 1-7, 2016.

VICENTINI, A.; VAN DER WERFF, H.; NICOLAU, S. Lauraceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S. et al. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia central**. Manaus: INPA, 1999. p. 150-179.

VILLARREAL, C. F. et al. Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: The involvement of distinct signalling pathways. **Life Sci.**, v. 85, p. 822-829, 2009.

VOILLEY, N. et al. 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. +-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, p. 418-424, 1998.



WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 9, p.703-10. 2007.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest** v. 120, n. 11, p 3742–344, 2010.

YASHPAL K, PITCHER G M, PARENT A, QUIRION R, CODERRE T J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol 12,13- dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **J Neurosci**. v. 15, p. 3263-3272, 2005.

YUNGE D. **Nerve and muscle excitation**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1976, p. 7-21.

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