

LÉSLEI BAUERMANN BORTOLANZA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TRITERPENO ÁCIDO
TORMÊNTICO ISOLADO DE CASCAS DA *Vochysia divergens*
(VOCHYSIACEAE) EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA E
CRÔNICA, EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

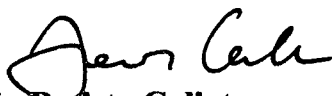
Florianópolis
2002

**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TRITERPENÓ ACIDO
TORMÊNTICO ISOLADO DAS CASCAS DA *Vochysia divergens*
(VOCHYSIACEAE) EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA E
CRÔNICA EM CAMUNDONGOS”**

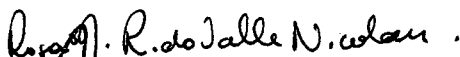
POR

LÉSLEI BAUERMANN BORTOLANZA

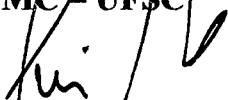
**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**



**João Batista Calixto
Orientador – PGFMC – UFSC**

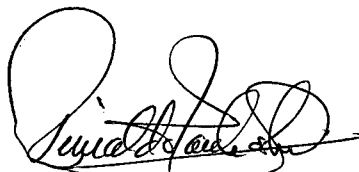


**Rosa Maria R. V. Nicolau
FMC – UFSC**



**Guilherme Suarez Kurtz
UFRJ**

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2002.



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa**

BORTOLANZA, Lésiei Bauermann. Atividade antinociceptiva do triterpeno pentacíclico ácido tormêntico isolado das cascas da *Vochysia divergens* (VOCHYSIACEAE) em modelos de nocicepção aguda e crônica em camundongos. Florianópolis, 2002. 78 p Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 15/02/2002

Estudo do efeito do ácido tormêntico em modelos de nocicepção aguda e crônica. O ácido tormêntico apresentou atividade antinociceptiva nos testes de nocicepção aguda induzida pela formalina, capsaicina, glutamato e na placa quente. O ácido tormêntico também apresentou efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção persistente causada pela constrição parcial do nervo ciático (dor neuropática) e a nocicepção inflamatória persistente causada pela administração do adjuvante completo de Freund em camundongos. Sua atividade antinociceptiva não parece envolver interação com os receptores glutamatérgicos, uma vez que o ácido tormêntico não inibiu a união específica (*binding*) de [³H] glutamato. Sua atividade antinociceptiva não está relacionada a efeitos relaxantes musculares ou sedativos sobre o sistema nervoso central, nem tão pouco interfere com a temperatura corporal. Assim, o ácido tormêntico ou seus derivados apresentam potencial interesse para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de dores crônicas, em especial aquelas observadas nas neuropatias e nos processos inflamatórios.

Palavras chave: ácido tormêntico, nocicepção aguda, nocicepção crônica, formalina, capsaicina, glutamato, placa quente, constrição parcial, nervo ciático, adjuvante completo de Freund, camundongos, receptores glutamatérgicos, união específica (*binding*), [³H] glutamato, neuropatias, processos inflamatórios.

Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.

James Baldwin

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para prosseguir na minha caminhada apesar das inúmeras dificuldades apresentadas.

Ao professor Dr. João Batista Calixto, meu especial agradecimento pela oportunidade de trabalharmos juntos, por todo o apoio, paciência, confiança, prontidão e caráter profissional que marcaram a orientação.

Ao meu esposo Juarez que tanto me apoiou na conclusão desse trabalho, ao meu filho Victor pelo carinho e compreensão.

Aos meus familiares em especial aos meus pais Almiro e Selmira pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo, a minha tia Naira pelo apoio e dedicação à minha família, aos meus irmãos Iomar, Rejane e Almiro Renei pelo incentivo, aos meus sogros Geni e Victório, as minhas cunhadas, cunhados e sobrinhos pelo carinho.

Ao Juliano pelo empenho e paciência na maneira de me auxiliar.

À Rosana e a Patrícia pela amizade, carinho e colaboração.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, pelo conhecimento transmitido.

As amigas Andrelina e Cláudia pelo carinho, amparo e apoio.

À Sônia Hess pelo fornecimento do ácido tormêntico para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Aos colegas da turma de mestrado e alunos de pós graduação, pela colaboração, amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas de pesquisa do grupo do professor Calixto: Alessandra, Rubens, Cristiano, Adair, Eunice, Cândida, Michel, Maria Martha, Valfredo, Rodrigo, Fernanda, Gabriela, Joice, Marien, Marina, Rafael, Giuiliano, Fernando, Niraldo, Karen, Betinha, Gisele, Daniela, pela amizade, carinho e oportunidade em compartilharmos juntos a caminhada pela Farmacologia.

A minha especial gratidão a todos que se dedicaram para a manutenção do biotério, para atender as melhores condições experimentais possíveis.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Dor crônica	06
1.1.1. Dor neuropática e inflamatória	06
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Animais	16
3.2. Injeção intratecal (i.t.)	16
3.3. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)	17
3.4. Estudo da atividade antinociceptiva	17
3.4.1. Nocicepção induzida pela formalina	17
3.4.2. Nocicepção induzida pela capsaicina	18
3.4.3. Nocicepção induzida pelo glutamato	19
3.4.3.1. Ensaio neuroquímico	20
3.4.3.1.1. Efeito do ácido tormêntico sobre a união específica (binding) de $[^3\text{H}]$ glutamato	20
3.4.4. Teste da placa quente	22
3.4.5. Medida do desempenho motor	22
3.4.5.1. Teste do rota rod	22
3.4.5.2. Campo aberto (CA)	23
3.4.6. Temperatura corporal	23
3.4.7. Mononeuropatia causada pela constrição parcial do nervo ciático	24
3.4.8. Modelo de nocicepção inflamatória crônica induzida por CFA	26
3.5. Drogas e Soluções Utilizadas	27
3.6. Análise Estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Estudo Da Atividade Antinociceptiva	28
4.1.1. Nocicepção induzida pela formalina	28

4.1.2. Nociceção induzida pela capsaicina-----	30
4.1.3. Nociceção induzida pelo glutamato-----	31
4.1.3.1. Efeito do ácido tormêntico sobre a união específica (binding) de [³ H]glutamato---	32
4.1.4. Teste da placa quente-----	33
4.1.5. Medida do desempenho motor -----	34
4.1.6. Temperatura corporal -----	35
4.1.7. Mononeuropatia causada pela constrição parcial do nervo ciático -----	36
4.1.8. Modelo de nociceção inflamatória crônica induzida por CFA-----	38
5. DISCUSSÃO -----	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	58
SUMMARY -----	78

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AT	Ácido tormêntico
ATP	Adenosina 1,4,5-trifosfato
°C	Graus Célsius
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	Ciclooxigenase-2
cm	Centímetros
DAINES	Drogas anti-inflamatórias não esteroidais
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Gramas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GMPc	Guanosina 3,5-monofosfato cíclico
h	Hora
I.A.S.P.	Associação Internacional para o Estudo da Dor

i.c.v.	Intracerebroventricular
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
kg	Quilograma
M	Molar
MAPK	Quinase ativada por mitógeno
µg	Microgramas
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
µl	Microlitros
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
s	Segundos
s.c.	Subcutâneo
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SIC	Receptor inativado por estiramento
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-acetato de tetradecanoilforbol
TTXr	Canais de sódio resistentes a tetrodotoxina
v.o.	Via oral
VR1	Receptor vanilóide do tipo 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido tormêntico -----	13
Figura 2 – – Aspectos gerais das partes aéreas da <i>Vochysia divergens</i> Pohl ----	14
Figura 3 – Efeito antinociceptivo do ácido tormêntico administrado pela via v.o. em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. -----	29
Figura 4 – Efeito antinociceptivo do ácido tormêntico, quando administrado pelas vias i.c.v. ou i.t., em relação à primeira (A) e a segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos -----	30
Figura 5 – Efeito antinociceptivo do ácido tormêntico administrado pela v.o., em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos -----	31
Figura 6 - Efeito antinociceptivo do ácido tormêntico administrado pelas vias i.p., v.o. ou i.pl., em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. -----	32
Figura 7 – Efeito do ácido tormêntico sobre a união específica (<i>binding</i>) de [3H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos-----	33
Figura 8 – Curvas tempo e dose resposta para o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico administrado pela v.o., no teste da placa quente. -----	34
Figura 9 – Efeito do tratamento dos animais com ácido tormêntico ou gabapentina no modelo do campo aberto. -----	35
Figura 10 – Efeito do tratamento causado pelo ácido tormêntico e morfina, administradas por v.o e s.c. respectivamente, na temperatura retal de camundongos.-----	35
Figura 11 – Efeito do tratamento agudo por via oral com ácido tormêntico ou gabapentina na alodínia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático.....	37
Figura 12 – Curva tempo resposta para o efeito antinociceptivo após tratamento por v.o. ácido tormêntico ou com gabapentina na alodínia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático. -----	38
Figura 13 – Efeito antinociceptivo dependente do tempo para o efeito antinociceptivo causado pelo tratamento por v.o. ácido tormêntico na alodínia mecânica induzida pelo CFA na pata ipsilateral e contralateral.-----	40

RESUMO

O ácido tormêntico é um triterpeno pentacíclico pertencente a série dos ursanos, encontrado em várias plantas, incluindo a *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), planta conhecida popularmente como "cambará branco". Os resultados apresentados no presente estudo mostram que o tratamento agudo sistêmico dos animais com ácido tormêntico mostrou-se efetivo em inibir a nocicepção de origem neurogênica causada tanto pela administração de formalina como pela administração de capsaicina em camundongos. Em adição, o ácido tormêntico administrado pela via sistêmica ou local foi efetivo em inibir a nocicepção induzida pelo glutamato. Por outro lado, a administração oral do ácido tormêntico também foi eficaz em inibir significativamente a nocicepção térmica quando avaliado no modelo da placa quente em camundongos. Além disso, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento prolongado por via oral com o ácido tormêntico reduziu de maneira significativa a nocicepção persistente causada pela constrição parcial do nervo ciático (dor neuropática) e a nocicepção inflamatória persistente causada pela administração do adjuvante completo de Freund em camundongos. Finalmente, embora o ácido tormêntico tenha sido efetivo em inibir a nocicepção causada pelo glutamato, os estudos de ligação específica com o uso de radioligante indicam que ele não foi capaz de ligar com os receptores glutamatérgicos em córtex de camundongos. Esses resultados são portanto relevantes considerando que até o momento não estão disponíveis drogas na clínica eficazes para o tratamento da dor persistente, especialmente aquelas relacionadas com as neuropatias. Assim, o ácido tormêntico ou seus derivados apresentam potencial interesse para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de dores crônicas, em especial aquelas observadas nas neuropatias e nos processos inflamatórios.

Uma parte deste trabalho foi submetido a publicação:

BORTALANZA, L.B.; FERREIRA, J.; HESS, S.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J.B. Anti-allodynic action of the triterpene tormentic acid in neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol.**,

1. INTRODUÇÃO

A dor é conceituada como uma percepção altamente complexa de uma sensação aversiva e desagradável em uma região específica do corpo. Pode ocorrer por nocicepção, quando é decorrente da ativação de nociceptores, e por deafferenciação, quando ocorre em uma área que foi parcial ou totalmente desnervada (SAKATA e GOZZANI, 1994).

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (FURST, 1999). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser definida como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou ainda descrita em termos deste tipo de lesão" (MERSKEY e BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999).

Além de uma sensação, a dor também é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual. A nocicepção leva à dor, que por sua vez causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme. O tipo de dor e o início das respostas protetoras são determinados por muitos fatores que atuam ao nível da medula espinhal e de estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modulação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BROSE, 1998). Existem vários locais onde mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa são gerados, dentre os quais destacam-se os tecidos lesados e adjacentes, sistema vascular, células imunes, nervos simpáticos e sensoriais. Além disso, existem mecanismos complexos através dos quais um transmissor pode agir, como receptores acoplados a múltiplos

mecanismos de transdução intracelular, sendo esses receptores amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais (MILLAN, 1999).

Existem diversos tipos de dor, denominadas “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, que estão associadas, respectivamente, com estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neuronal, disfunção de um nervo ou fatores psicológicos (MILLAN, 1999). Além disso, outras desordens comumente ocorrem em pacientes que experimentam a dor, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada à um estímulo doloroso), a alodínia (dor em resposta à um estímulo não doloroso) ou a hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSION, 1999).

Os sinais nocivos são gerados por ativação de fibras aferentes do tipo A δ e C, que respondem a uma variedade de estímulos fisiológicos intensos tais como: calor, frio, compressão e substâncias químicas endógenas ou exógenas potencialmente nocivas. Além destas, outro tipo de fibra que pode estar envolvido na transmissão do estímulo nocivo são as fibras A β , que normalmente detectam estímulos táteis inócuos aplicados à pele, porém em condições especiais são capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (40-80 m/s). Estas fibras são mielinizadas e de grande diâmetro. Enquanto que as fibras A δ , também de condução rápida (2,5-36 m/s), normalmente são relativamente delgadas, pobremente mielinizadas e respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Finalmente, as fibras C são caracterizadas por serem relativamente delgadas, não mielinizadas, responsáveis pela condução lenta do estímulo doloroso (0,5-1,7 m/s) e responderem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (ADRIAENSEN et al., 1983; COHEN e PERL, 1990; MARKENSON, 1996).

Os neurônios que respondem preferencialmente a estímulos nocivos são chamados de nociceptores e estão geralmente localizados na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central e seus corpos celulares encontram-se dentro do gânglio da raiz dorsal (DRAY e PERKINS, 1997;

GRUBB, 1998; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999). Todos os tecidos, com exceção da neurópila do sistema nervoso central, são inervados por fibras aferentes. Entretanto, suas propriedades diferem acentuadamente se estes aferentes forem somáticos (inervando pele, articulações, músculos) ou viscerais (inervando os tecidos cardiovascular e respiratório, o trato gastrointestinal e os sistemas reprodutores) (DRAY e PERKINS, 1997).

No corno dorsal da medula espinhal, os nociceptores primários fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, cujos axônios cruzam a medula espinhal para ascender até o trato espinotalâmico, chegando ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensorial, onde ocorre a somatização do estímulo nocivo, ou ainda podem emitir axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998). Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à região rostral da ponte, fazendo sinapses em vários núcleos, como o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular gigantocelular. Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação descendente dos neurônios de segunda ordem. Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição descendente (por exemplo: opióides endógenos, serotonina e noradrenalina) parecem inibir a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; FURST, 1999; MILLAN, 1999).

Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e que pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (CARR e GOUDAS, 1999). Já a dor crônica pode ser perpetuada por outros fatores além daqueles que causaram a dor propriamente dita, podendo permanecer por meses ou anos (ASHBURN e STAATS, 1999; LOESER e MELZACK, 1999). A dor crônica pode acarretar conseqüências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas e psicossociais deletérios, além de envolver grave estresse emocional (BONICA, 1990).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na transmissão do sinal doloroso tem progredido muito nos últimos anos, em grande parte devido a um aprimoramento na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia das fibras aferentes e no processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal (para revisão ver: BESSON e CHAOUCH, 1987; GRUBB, 1998; FURST, 1999; MILLAN, 1999). Este progresso foi possível pelo uso de múltiplos protocolos experimentais, incluindo estudos comportamentais, eletrofisiológicos *in vivo* e *in vitro*, estudos anatômicos e principalmente através de técnicas de biologia molecular (GRUBB 1998; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Contudo, apesar de todos esses avanços, os mecanismos exatos envolvidos na gênese e na transmissão da dor ainda não são totalmente conhecidos (MACFARLENE et al., 1997).

Embora diversos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central tenham sido estabelecidos recentemente, os mecanismos envolvidos na sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular dos diversos receptores envolvidos na gênese da nocicepção permitiu um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e, conseqüentemente, de drogas que atuam na modulação central e periférica da nocicepção. Os mecanismos envolvidos na transdução neuroquímica da dor geralmente envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos com canais iônicos de membrana dependente de voltagem (canais de sódio, potássio, cálcio, cloro, entre outros), canais iônicos operados por receptor (receptor N-metil-D-aspartato – NMDA -, receptor colinérgico nicotínico), receptores associados à tirosina quinase (fator de crescimento neural – NGF, por exemplo) ou com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas regulatórias denominadas de proteínas G, como acontece com os receptores das prostaglandinas e bradicinina, entre outros (RANG et al., 1994; LEVINE e TAIWO, 1994; WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000a, b).

Os mediadores inflamatórios, ao interagirem com tais receptores, ativam os respectivos sistemas efetores intracelulares, promovendo a regulação funcional da célula que, dependendo do estímulo, pode ser uma regulação crescente ou uma regulação decrescente. No caso da regulação crescente (*upregulation*) ou hiperalgisia, alguns mediadores inflamatórios como o NGF e citocinas, quando liberados, promovem a expressão de genes que codificam a síntese de mais proteínas dos seus receptores, desencadeando uma resposta mais intensa ao estímulo nociceptivo (WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999).

Diversos mediadores inflamatórios têm sido identificados como potencialmente hiperalgésicos, incluindo a interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), NGF, prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, serotonina, adenosina, histamina, substância P e outros. Acredita-se que alguns destes mediadores possam agir diretamente no nociceptor, promovendo redução no limiar de sensibilidade (prostaglandinas, serotonina, adenosina e alguns metabólitos eicosanóides), enquanto que outros agiriam produzindo a hiperalgisia indiretamente pela ação em outros tipos de células, como em neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático ou em neutrófilos e macrófagos, promovendo a liberação de outros mediadores hiperalgésicos (LEVINE e TAIWO, 1994; MILLAN, 1999).

Por outro lado, também pode ocorrer uma regulação decrescente (*downregulation*) ou dessensibilização de receptores, seja pela internalização do receptor, liberação de segundos mensageiros inibitórios, modulação da transcrição gênica, ou ainda através de mecanismos de retroalimentação (*feedback*) negativa dos sistemas efetores intracelulares e liberação de mediadores inflamatórios (DRAY e PERKINS, 1993; MILLAN, 1999). Também tem sido constatado que os agentes que estimulam a formação de GMPc produzem uma regulação decrescente dos nociceptores. Parece que a regulação funcional crescente ou decrescente depende do balanço existente entre as concentrações de AMPc/GMPc nas vias nociceptivas (FERREIRA et al., 1991; DRAY e PERKINS, 1993; FERREIRA, 1993; MILLAN, 1999).

1.1. Dor crônica

A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação à sua persistência, alterações adaptativas, tais como neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, e dificuldade de tratamento (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999). As dores crônicas mais comuns incluem a síndrome dolorosa miofascial, a fibromialgia, a dor neuropática, a dor associada à artrite, a dor do membro fantasma, e as síndromes dolorosas centrais (ASHBURN e STAATS, 1999).

1.1.1. Dor neuropática e inflamatória

Os neuropeptídeos estão presentes em subpopulações de nociceptores aferentes primários em circunstâncias normais. Em tal situação, os neuropeptídeos mais comumente encontrados nos aferentes primários são a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Em condições patológicas, como lesões nervosas ou inflamação periférica, a presença dos peptídeos e seus receptores nos aferentes primários é substancialmente alterada. Por exemplo, os níveis de substância P e de CGRP estão aumentados durante a inflamação, mas drasticamente diminuídos em células dos gânglios da raiz dorsal na neuropatia. Outros peptídeos que normalmente estão presentes nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal em pequenas quantidades em condições fisiológicas, como a galanina e o neuropeptídeo Y, podem permanecer diminuídos ou inalterados durante a inflamação e aumentados na neuropatia. Portanto, existem diversas alterações nos níveis de peptídeos e seus receptores nos neurônios do gânglio da raiz dorsal nestas condições patológicas (WIESENFELD-HALLIN e XU, 2001).

As lesões de nervos periféricos freqüentemente resultam em dor que pode estar associada com hiperalgesia e alodínia. Esta é referida como dor neuropática periférica e pode resultar de trauma mecânico, efeitos tóxicos de drogas, doenças como diabetes ou síndrome da

imuno-deficiência adquirida (HIV/AIDS). A dor neuropática periférica é caracterizada por ser difícil de ser tratada e os mecanismos envolvidos na sua gênese ainda são pouco conhecidos (THEODOSIOU et al., 1999). A terapia atualmente disponível não oferece um alívio satisfatório deste tipo de dor (SELTZER, 1995). A dor neuropática é gerada e modulada tanto por mecanismos periféricos como centrais. Na periferia, desenvolve-se um neuroma no local onde ocorreu a lesão, esse neuroma produz descargas ectópicas que chegam ao sistema nervoso central e são interpretadas como originadas do membro lesionado (MACFARLANE et al., 1997). As descargas ectópicas periféricas podem provocar reorganização e alterações nas fibras que chegam ao corno dorsal da medula espinhal. Ocorre uma queda do controle inibitório da dor, causado pela diminuição dos receptores para opióides e ácido γ -aminobutírico (GABA) e por lesão em interneurônios inibitórios induzidos por mecanismos de excitotoxicidade (WOOLF e MANNION, 1999). Dessa maneira, os estímulos excitatórios periféricos podem se tornar exagerados e neurônios do corno dorsal da medula espinhal podem despolarizar-se espontaneamente. Além disso, as fibras A β (de baixo limiar) que transmitem estímulos mecânicos inócuos reorganizam-se anatomicamente e passam a fazer sinapse na lâmina II da medula espinhal, participando da transmissão da dor e produzindo neurotransmissores como substância P e CGRP (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF e MANNION, 1999). A lesão axonal também causa transporte retrógrado de proteínas ao núcleo, causando hiperexcitabilidade do soma (na raiz do gânglio dorsal) e degeneração trans-sináptica (YAMAMOTO e YAKSH, 1993; WATKINS et al., 1995).

Com a queda da atividade dos mecanismos fisiológicos que controlam a dor, a estimulação das fibras C causa liberação de glutamato, substância P e CGRP, que sensibilizam os neurônios secundários do corno dorsal da medula espinhal. Essa sensibilização provoca respostas nociceptivas exageradas e dessa forma, permite que estímulos inócuos sejam codificados como dolorosos. A sensibilização central também está implicada com o fenômeno de

hiperalgesia secundária, isto é, hiperalgesia em sítios vizinhos à lesão (WOOLF e MANNION, 1999).

Além do sistema neuronal, a lesão nervosa pode envolver componentes das respostas inflamatórias, principalmente associados à remoção dos axônios ou das células de Schwann destruídas. As células envolvidas com o processo inflamatório podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais (TRACEY e WALKER, 1995; BENNETT, 1999). Sabe-se que a hiperalgesia causada pela lesão de nervos periféricos pode ser resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias por células imunes ativadas. Há uma migração maciça e rápida de macrófagos, que liberam citocinas pró-inflamatórias no sítio da lesão. Outras células, como as células de Schwann e a micróglia também podem produzir fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas-1 e 6 (IL-1 e IL-6) (WATKINS et al., 1995). Os macrófagos parecem ser responsáveis pela sensibilidade anormal a vários estímulos, assim como pela atividade espontânea aberrante dos nervos periféricos lesionados. Além disso, os macrófagos podem liberar glutamato, além de citocinas, causando aumento da excitabilidade neuronal (WATKINS et al., 1995).

Entre os mediadores inflamatórios de maneira geral, a produção e ação das cininas é vista como crítica para a iniciação da dor, produção de alodínia e hiperalgesia (LEVINE et al., 1993; DRAY e PERKINS, 1997). As vias bioquímicas envolvidas na síntese e degradação das cininas compreendem mecanismos bem estabelecidos (REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992). As cininas formadas a partir de precursores chamados cininogénios, através da ação das cininogenases, em resposta a estímulos fisiológicos, ou durante o processo inflamatório, também são importantes mediadores da dor inflamatória (MURRAY et al., 1990; BEAUBIEN et al., 1991). Depois de formadas, as cininas, exercem uma série de efeitos biológicos que envolvem principalmente a regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, a regulação da pressão arterial, o transporte de glicose e de eletrólitos, além de estimularem a reabsorção

óssea e a proliferação celular (BHOOLA et al., 1992). Além dessas ações, as cininas participam de vários eventos pró-inflamatórios que incluem dilatação venular, aumento da permeabilidade vascular e estimulação de fibras aferentes sensoriais do tipo A δ e C (MARCEAU et al., 1983; HARGREAVES et al., 1988; PROUD e KAPLAN, 1988; DRAY e PERKINS, 1997).

Pacientes com dor neuropática normalmente não respondem satisfatoriamente ao tratamento com drogas analgésicas convencionais como por exemplo, os antiinflamatórios não-esteroidais e opióides. Estes pacientes respondem aos antidepressivos tricíclicos ou inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina ou, em outras situações, com anticonvulsivantes, todos com eficácia limitada e efeitos adversos indesejáveis (KINGERY, 1997). Procedimentos neurocirúrgicos e neurocirurgia funcional, incluindo estimulação do cérebro ou da medula espinhal, são procedimentos controversos, enquanto a estimulação transcutânea do nervo pode promover algum alívio. Os anestésicos locais também têm sido usados para bloquear pontos de disparo de estímulos nociceptivos em, nervos periféricos, raízes dorsais, plexos e no sistema nervoso simpático, porém com efeito de curta duração. O bloqueio permanente com injeção de fenol ou a crioterapia apresentam riscos de prejuízo funcional irreversível e não têm sido avaliados em modelos controlados por placebo. A administração epidural de drogas tais como clonidina, esteróides, opióides ou midazolam é invasiva, tem efeitos locais e a eficácia destas drogas não tem sido avaliada adequadamente.

Desta forma, atualmente não existe tratamento adequado para prevenir o desenvolvimento da dor neuropática (NIKOLAJSEN et al., 1997) nem medidas adequadas e específicas para controlar a dor neuropática já instalada (KINGERY, 1997; KOLTZENBURG, 1998). Portanto, é necessário desenvolver medidas terapêuticas mais eficazes que possam controlar mecanismos e sintomas da dor neuropática (WOOLF e MANNION, 1999).

A dor neuropática é classificada de acordo com a etiologia do agente causador da lesão ao sistema nervoso ou de acordo com a distribuição anatômica da dor. Embora esta

classificação possa ser usada no diagnóstico diferencial da neuropatia e para modificações no tratamento da doença, ela não oferece sustentação para o tratamento clínico da dor. A relação entre a etiologia, mecanismos, e sintomas é complexa. A dor que se manifesta em diversas doenças pode apresentar mecanismos comuns. Por outro lado, um mesmo mecanismo pode ser responsável por muitos sintomas diferentes. Além disso, o mesmo sintoma em dois pacientes pode ser causado por mecanismos diferentes. Finalmente, mais de um mecanismo pode estar em atividade em um único paciente e estes mecanismos podem alterar-se no transcorrer do processo. Portanto, em pacientes com dor neuropática é impossível, ainda, reconhecer os mecanismos responsáveis pela dor com base somente na etiologia ou na distribuição e natureza dos sintomas. Sem a identificação dos mecanismos, uma boa estratégia de tratamento para pacientes com esse tipo de dor não pode ser adotada (WOOLF e MANNION, 1999).

A dor neuropática periférica manifesta-se como dor espontânea (dor independente de estímulo) ou hipersensibilidade dolorosa provocada por um estímulo após dano ou alterações nos neurônios sensoriais (dor provocada por estímulo). As substâncias químicas que existem ao redor dos terminais periféricos dos nociceptores determinam uma sensibilidade basal e limiar de ativação, sendo que mediadores inflamatórios e citocinas podem sensibilizar terminais de modo que estes comecem a responder normalmente a estímulos térmicos e mecânicos inócuos. A inflamação do nervo ou gânglio nervoso pode também alterar a função de neurônios pelo surgimento de novos mensageiros químicos que alteram a função bioquímica ou sobrevivência das células. A perda de células ou axônios reduz a sensibilidade e induz mudanças nos neurônios vizinhos que sobrevivem (WOOLF e MANNION, 1999).

Diante do exposto, é fácil entender porque o tratamento da dor é um dos principais desafios para a terapêutica médica. A terapia analgésica atual consiste principalmente na escolha de duas classes de drogas, os opióides e as drogas anti-inflamatórias não esteroidais. Embora tenham sido produzidos derivados sintéticos e aprimoradas as técnicas de

administração estes avanços não permitiram eliminar os efeitos colaterais típicos dessas classes de substâncias. Os analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais causam prejuízos gastrointestinais e renais, enquanto que os opióides causam sedação, depressão respiratória, náusea, constipação intestinal e possivelmente dependência, entre outros efeitos (WIESESENFELD-HALLIN, 1998). Apesar do avanço significativo na elucidação dos processos de transmissão da dor, a morfina (opióide), mesmo com os seus efeitos colaterais, continua sendo a substância mais utilizada para o tratamento da dor (para revisão veja: PERKINS e DRAY, 1996). Devido a esta complexidade e dificuldade, não só para o entendimento, mas também para o estabelecimento de medidas terapêuticas através do uso de drogas, torna-se necessário o delineamento de novas alternativas terapêuticas para auxiliar na terapia da dor.

Apesar dos esforços da comunidade científica para desenvolver novas drogas analgésicas e dos avanços recentes ocorridos em áreas como a biologia molecular, eletrofisiologia e genética, o tratamento da dor, especialmente a dor crônica ainda constitui um grande desafio.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática comum de várias civilizações e tem sua origem nas tradições milenares da China e Índia (ERGIL, 1996). Esta forma de tratamento, hoje bastante difundida no mundo inteiro, foi inicialmente utilizada em grande escala pela população rural e menos favorecida financeiramente, devido ao difícil acesso que tinham e ainda têm a medicina alopática convencional. O aumento do consumo de fitoterápicos (medicamentos fabricados a partir de plantas medicinais), inicialmente por indicação das terapias chamadas "não convencionais" e depois por toda a comunidade médica (HOFFMAN e LEADERS, 1996), associado ao desenvolvimento de técnicas avançadas para o estudo das suas reais propriedades farmacológicas, vem contribuindo para que os produtos naturais ocupem posição expressiva no desenvolvimento de substâncias terapêuticas (CRAGG et al., 1997; DE SMET, 1997; SHU, 1998, CALIXTO et al., 2000a, b; 2001).

Diversas drogas analgésicas importantes hoje disponíveis no mercado foram obtidas direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. Dentre elas, podemos citar a morfina, obtida da *Papaver somniferum*, a capsaicina, extraída do gênero *Capsicum* e o ácido salicílico, extraído do gênero *Salix*. A partir do ácido salicílico, Dreser sintetizou, em 1899, o ácido acetil salicílico, droga ainda disponível comercialmente na forma original. Portanto, a necessidade de novas substâncias analgésicas tem renovado o Interesse da maioria das companhias farmacêuticas por derivados de plantas como fonte de novas drogas clinicamente úteis (para revisão veja: SHU, 1998; DAMAJ et al., 1999; CALIXTO et al., 2000a, b; 2001).

Dentre os compostos naturais que têm chamado a atenção pelos seus efeitos farmacológicos e por sua baixa toxicidade estão os triterpenos pentacíclicos (SAFAYHI e SAILER, 1997; OTUKI et al., 2001). Os triterpenos pentacíclicos são compostos encontrados em diversas famílias de plantas superiores (Lauraceae, Rosaceae, Vochysiaceae), e são de fácil purificação (para revisão veja: MAHATO e SEM, 1997). Dentre as propriedades farmacológicas mais comuns destes compostos podem ser mencionadas: inibição da promoção de tumor, atividade anti-inflamatória (ácidos glicirretínico, ursólico, oleanólico e cratególico, β -amirina e outros) (SUGISHITA, 1982; YING, 1991; SAFAYHI e SAILER, 1997), efeito anti-edematogênico (ácido tormêntico) (RECIO et al., 1995), efeito protetor na peroxidação lipídica (ácidos oleanólico e ursólico) (LIU, 1995) e também hipoglicemiante (ácido tormêntico) (VILLAR, 1986; IVORRA, 1988).

O ácido tormêntico é um triterpeno pentacíclico cuja estrutura química compreende cinco anéis com oito centros quirais (Figura 1) e é pertencente a série dos ursanos (para revisão veja: RECIO et al., 1995; MAHATO e SEM, 1997). Esse composto é encontrado em várias plantas como a *Ocotea suaveolens*, *Poterium ancistroides*, *Hyptis capitata* e *Vochysia divergens* Pohl (HOUGHTON e LIAN, 1986; VILLAR et al., 1986; LEE et al., 1988; HESS e MONACHE, 1999).

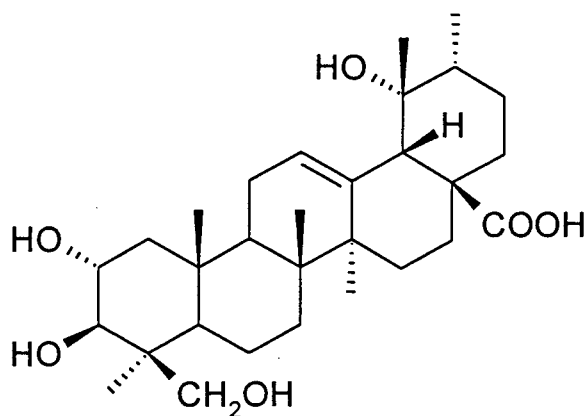


Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido tormêntico

O ácido tormêntico é extraído das cascas da *Vochysia divergens* Pohl (Figura 2), planta pertencente a família Vochysaceae, originária da Amazônia mas também encontrada em solos úmidos do pantanal do Mato Grosso do Sul. A *Vochysia divergens* é conhecida popularmente como “cambará branco” e utilizada na medicina popular contra infecções e asma (POTT e POTT, 1994).

Existem relatos atribuindo diversas atividades farmacológicas ao ácido tormêntico. Em 1996, XU e colaboradores demonstraram a atividade inibitória *in vitro* sobre a protease do HIV-1 apresentada pelo ácido tormêntico isolado a partir da *Geum japonicum*. VILLAR e colaboradores (1986) isolaram o ácido tormêntico a partir da *Poterium ancistroides* (Rosaceae), popularmente utilizada para o tratamento do diabetes, e verificaram propriedades hipoglicemiantes desse princípio ativo em ratas. Estudos complementares realizados por IVORRA e colaboradores (1988) atribuíram esta propriedade hipoglicemiante a uma provável interação com células β das ilhotas de Langerhans.

HIRAI e colaboradores (2000) verificaram que o triterpeno ácido tormêntico é um dos responsáveis pela resistência de morangos à infecção por fungos (*Colletotrichum fragariae*).

ISOBE e colaboradores (1989) isolaram o ácido tormêntico a partir das folhas da *Leucoseptrum stellipillum* (MIQ) e demonstraram sua atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*.

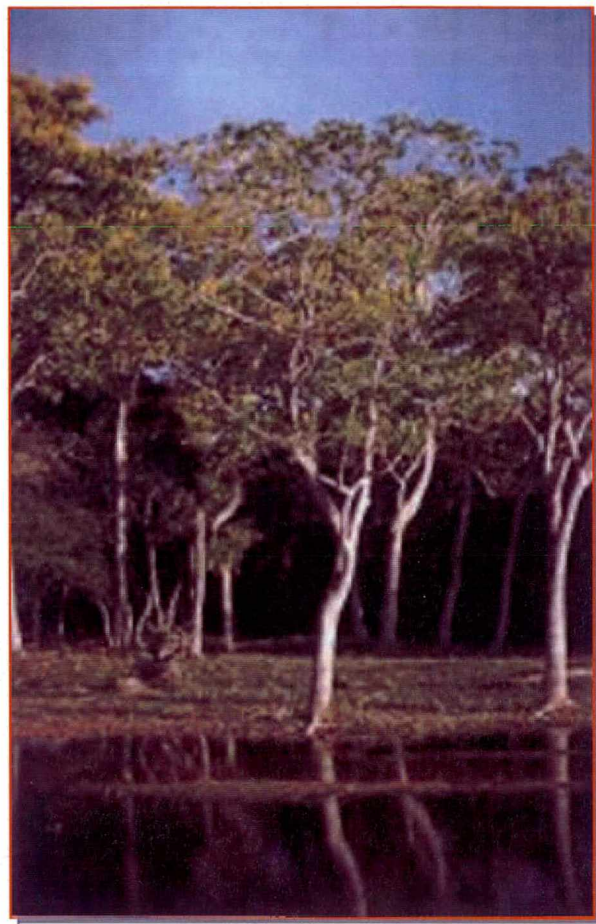


Figura 2 – Aspectos gerais das partes aéreas da *Vochysia divergens* Pohl. (Fonte: MARQUES et al., 2001).

Em 1995, RECIO e colaboradores observaram atividades antiedematogênicas sistêmicas e tópicas do ácido tormêntico contra edema de pata induzido por carragenina ou no edema de orelha induzido por 12-O-acetato de tetradecanoilforbol (TPA), respectivamente. A propriedade antinociceptiva do ácido tormêntico foi inicialmente descrita por BEIRITH e colaboradores (1999), utilizando o modelo de nocicepção induzida pela formalina. A administração intraperitoneal do triterpeno causou inibição tanto da fase neurogênica (primeira

fase) quanto da fase inflamatória (segunda fase) do modelo, com DI_{50} de 12,5 (8,9 - 17,8) e 10,6 (7,8 - 14,3) mg/kg, respectivamente. O ácido tormêntico mostrou-se ser cerca de 2 a 8 vezes mais potente em inibir a fase inflamatória no teste da formalina quando comparado com algumas drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINES) como a aspirina, acetaminofeno e dipirona (BEIRITH, et al., 1999). Contudo, o que se destaca é sua eficácia e potência em prevenir a resposta nociceptiva neurogênica, contra a qual a maioria das DAINES é ineficaz. As ações antinociceptivas do ácido tormêntico se assemelham àquelas da morfina e dipirona (BEIRITH et al., 1999). Esses resultados, analisados em conjunto, despertaram o interesse em investigar a atividade do ácido tormêntico em outros modelos de nocicepção, particularmente na dor persistente.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Analisar o efeito antinociceptivo do triterpeno pentacíclico ácido tormêntico, administrado através das vias sistêmica, tópica, espinhal e supraespinhal, em modelos agudos de nocicepção química e térmica em camundongos.
- 2) Investigar o efeito do tratamento prolongado por via oral com o ácido tormêntico na nocicepção persistente em camundongos, através do emprego de dois modelos de nocicepção: a neuropatia induzida por constrição parcial do nervo ciático e a dor inflamatória causada pela administração de adjuvante completo de Freund (CFA).
- 3) Avaliar a possível interação do ácido tormêntico com os receptores glutamatérgicos, com o auxílio de técnica de união específica (*binding*) em membranas de sinaptossomos de córtex cerebral de camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos e fêmeas, pesando entre 20 e 30 g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (23 ± 2 °C), em ciclo 12 h claro/12 h escuro, tratados com água e ração *ad libitum* e permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de 20 ± 3 °C.

3.2. Injeção intratecal (i.t.)

A administração de drogas através da via i.t. foi feita de acordo com o método descrito por HYLDEN e WILCOX (1980), com algumas modificações. Inicialmente, os animais foram imobilizados em um contentor para posterior injeção de um volume de 5 μ l da droga em análise ou do veículo entre as vértebras L5 e L6, com uma microseringa conectada a um tubo de polietileno. As respostas nociceptivas foram avaliadas após 10 min.

3.3. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)

Para a administração de drogas através da via i.c.v., seguiu-se o método descrito por LAURSEN e BELKNAP (1986), com algumas modificações. Após serem levemente anestesiados com éter, os animais receberam uma injeção contendo 5 μ l da droga em análise ou veículo num dos ventrículos laterais (coordenadas para localização em relação ao bregma: 1 mm lateral, 1 mm rostral, 3 mm vertical). As respostas nociceptivas foram avaliadas após 10 min.

3.4. Estudo da atividade antinociceptiva

Os experimentos relacionados a seguir foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico, administrado por diversas vias, sobre modelos de nocicepção térmica, química e mecânica. A possível interação do ácido tormêntico com receptores glutamatérgicos foi verificada através de ensaio neuroquímico. A possibilidade de seu efeito antinociceptivo estar associado a efeitos não específicos como queda da temperatura corporal, sedação ou relaxamento muscular dos animais também foi avaliada.

3.4.1. Nocicepção induzida pela formalina

Para analisar o possível efeito antinociceptivo do ácido tormêntico, foi utilizado o modelo da nocicepção induzida pela formalina, que permite distinguir dois tipos de dor, uma de origem neurogênica, como resultado da estimulação direta dos neurônios nociceptivos e outra de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de diversos mediadores inflamatórios. O teste da formalina permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre

durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina, e a segunda, que ocorre ente 15 e 30 min após a injeção de formalina (resposta tônica à dor).

Os procedimentos foram realizados como descrito anteriormente por DUBUISSON e DENNIS (1977) e SHIBATA e colaboradores, (1989), com algumas modificações (VAZ et al., 1996). Foram injetados 20 μ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região plantar (intraplantar; i.pl.) da pata posterior direita, em camundongos. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro invertido (20 cm de diâmetro) e um espelho posicionado na parte posterior do funil foi utilizado para facilitar a visualização. A seguir, foi cronometrado por um período de 30 min (0-5 min, primeira fase e 15-30 min, segunda fase) o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse período considerado como indicativo de dor.

Para avaliar o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico neste modelo os animais foram tratados com este composto através das vias oral (0.3– 100 mg/kg), 1 h antes da injeção de formalina, i.c.v. (0.3 – 30 μ g/sítio) ou i.t. (0.3 – 30 μ g/sítio) 10 min antes da injeção de formalina. Os grupos controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para diluir o ácido tormêntico.

Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tibio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) das patas direita e esquerda foi considerada como índice de edema.

3.4.2.Nocicepção induzida pela capsaicina

Este modelo, proposto por SAKURADA et al., (1992), é importante para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz estimulação seletiva de um grupo específico de neurônios nociceptivos, causando a liberação

periférica e espinhal de vários neuropeptídeos (substância P, neurocinina A e neurocinina B) e de glutamato (SAKURADA et al., 1992; 1993). Este teste foi empregado visando evidenciar a possível interação do ácido tormêntico com mediadores liberados de fibras sensíveis a capsaicina.

Antes do teste os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro transparente (20 cm de diâmetro) invertido por um período de adaptação de, no mínimo 20 min. Grupos de animais foram tratados com ácido tormêntico por via oral (v.o., 0.1 – 10 mg/kg), 1 h antes. Posteriormente, cada animal recebeu 20 μ l de solução de capsaicina (1,6 μ g/pata), injetada por via i.pl. Os animais foram observados individualmente durante 5 min após a injeção de capsaicina. O tempo em que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado e considerado como indicativo de dor.

3.4.3. Nociceção induzida pelo glutamato

O glutamato é um neurotransmissor importante na transmissão da informação nociceptiva tanto no SNC quanto na periferia. Quando aplicado intraplantarmente, o glutamato pode causar hiperalgesia em ratos (JACKSON et al., 1995). Levando em consideração estes relatos, foi avaliada a possível ação antinociceptiva do ácido tormêntico na nociceção induzida pelo glutamato, quando injetado na superfície plantar da pata traseira direita de camundongos (BEIRITH et al., 2002). Foram injetados 20 μ l de glutamato (30,0 μ mol/pata) na região plantar (intraplantar; i.pl.) da pata posterior direita, em camundongos. Logo após a injeção, os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro invertido (20 cm de diâmetro) e um espelho posicionado na parte posterior do funil foi utilizado para facilitar a visualização. A seguir, foi cronometrado por um período de 15 min o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato, sendo esse período considerado como indicativo de dor.

A fim de avaliar o efeito do ácido tormêntico sobre a nocicepção induzida neste modelo, diferentes grupos de camundongos receberam ácido tormêntico por via intraperitoneal (1 – 200 mg/kg) 30 min antes, oral (1 – 30 mg/kg) 1 h antes ou intraplantar (10 - 100 µg/pata), co-injetada em associação com glutamato (30,0 µmol/pata, i.pl.).

Para investigar se a antinocicepção causada pelo ácido tormêntico estaria associada a uma atividade antiedematogênica neste modelo, ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tíbio-tarsal e comparadas conforme descrito acima.

3.4.3.1. Ensaio Neuroquímico

A fim de avaliar a possível interação do ácido tormêntico com receptores glutamatérgicos utilizou-se a técnica da união específica de [³H]glutamato.

3.4.3.1.1. Efeito do ácido tormêntico sobre a união específica (*binding*) de [³H]glutamato

Os camundongos foram sacrificados por decapitação e os córtices cerebrais foram dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes de uma solução de sacarose 0,32 M, Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 e MgCl₂ 1 mM em um *potter* de vidro contendo duas vazas. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g durante 15 min. O sobrenadante (S1) dessa centrifugação foi separado e mantido em gelo. O precipitado contendo a fração nuclear, detritos celulares e um pouco de mielina, foi resuspenso no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente a 1.000 g durante 15 min. O segundo precipitado foi desprezado, o sobrenadante (S2) misturado a S1, e a mistura centrifugada a 27.000 g, durante 15 min. O precipitado resultante foi resuspenso em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM, pH 7,4, onde permaneceu no gelo durante 60 min, depois deste período foi

submetido a centrifugação a 27.000 g durante 15 min. O precipitado resuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 e centrifugado a 27.000 g durante 15 min (SOUZA e RAMÍMREZ, 1991), procedimento que foi repetido três vezes. O precipitado resultante da terceira lavagem foi resuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 de forma a obter uma concentração protéica em torno de 2,0 mg de proteína por ml. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Os ensaios de união específica (*binding*) de [³H]glutamato foram realizados em triplicata em um volume total de 0,5 ml contendo 0,1 ml de membrana (0,2 - 0,3 mg proteína), tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, ligante radioativo ([³H]glutamato, 46 Ci/mmol) 40 nM, na presença ou ausência de ácido tormêntico (concentração na ordem de 19,8 e 198,4 μ M). A união inespecífica foi realizada da mesma maneira, com exceção de que 40 μ M de glutamato não-radioativo (*displacer* ou deslocador) foram acrescentados ao meio de incubação. Após 15 min de incubação a 30 °C, as membranas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min para separar o [³H]glutamato não ligado às membranas. O sobrenadante foi descartado, as paredes dos tubos *ependorf* e as superfícies dos precipitados (*pellets*) foram completa e cuidadosamente lavadas com água milli-Q a 4 °C. Após a secagem das paredes dos *ependorf*, o *pellet* foi resuspenso com solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% com o intuito de solubilizar as proteínas. Após 12 h foi retirada uma alíquota de cada tubo e a estas foi acrescentado o líquido de cintilação. A radioatividade foi avaliada em cintilador (Packard – 1600 TR). A união específica (*binding*) foi calculada como a diferença entre os valores da união específica (*binding*) na ausência e na presença do glutamato não-radioativo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

3.4.4. Teste da placa quente

O teste da placa quente foi utilizado de acordo com o método descrito anteriormente por WOOLFE e MCDONALD (1944), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo-DS 37) foi mantido a 52 ± 1 °C. Camundongos foram tratados com ácido tormêntico (10 – 100 mg/kg, v.o.), ou com veículo (10 ml/kg). A nocicepção foi avaliada 1, 2, 3 e 4 h após o tratamento. Para tal, os animais foram colocados em um cilindro de vidro com 24 cm de diâmetro sobre uma superfície aquecida. O tempo decorrido entre a colocação do animal na superfície aquecida e o aparecimento da reação de lambe as patas foi registrado e considerado como índice de latência a dor. Um tempo máximo de latência de 30 s foi utilizado para prevenir possíveis danos teciduais. Cada animal foi avaliado 24 h antes do teste a fim de obter uma resposta homogênea entre os grupos (10 ± 2 s) eliminando-se aqueles que apresentaram uma latência inadequada na temperatura utilizada.

3.4.5. Medida do desempenho motor

Com o intuito de verificar os possíveis efeitos relaxantes musculares não específicos ou sedativos do ácido tormêntico sobre o sistema nervoso central, os animais foram avaliados no teste do *rota rod* (ROSLAND et al., 1990) e no campo aberto (SIEGEL, 1946; ARCHER, 1973).

3.4.5.1. Teste do *rota rod*

O aparelho de *rota rod* (Ugo Basile, Modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por min. Os camundongos foram selecionados com 24 h de antecedência. Foram escolhidos os animais que tiveram apenas

uma queda durante 60 s. O tempo em que os animais permaneceram sobre a barra foi cronometrado em segundos. No dia do experimento, os animais foram tratados com ácido tormêntico (100 mg/kg, v.o.) ou com veículo 1 h antes de serem submetidos ao teste. Os resultados foram expressos como tempo (s) que os animais permaneceram sobre o aparelho de rota-rod. O tempo máximo utilizado foi de 60 s.

3.4.5.2. Campo aberto (CA)

Os animais foram tratados com ácido tormêntico (30 mg/kg, v.o.), gabapentina (70 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo 1 h antes de serem submetidos ao teste. O aparelho consiste em uma caixa (30 x 15 x 30 cm) dividida em nove quadrados. Cada animal foi colocado individualmente em um canto da caixa. A tendência natural de um animal perante um ambiente novo é a de explorá-lo (MONTGOMERY, 1955). Para avaliar esta atividade foram registrados os seguintes parâmetros: movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões do campo, definida como exploração horizontal), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e de levantar (*rearing* conhecida como exploração vertical), durante um período de 5 min.

3.4.6. Temperatura corporal

Segundo MOGIL e colaboradores (1998), a alteração na temperatura corporal dos animais submetidos ao tratamento com drogas pode confundir resultados antinociceptivos tanto no teste da formalina como na placa quente. Para avaliar a possível interferência do tratamento com o ácido tormêntico na variação da temperatura corporal, foram utilizados camundongos machos pesando entre 20 e 28 g, e a temperatura basal dos animais foi avaliada com auxílio de um termômetro retal (Lumiscopes). Aproximadamente 1 h após a medida basal, os animais foram separados em 3 grupos e tratados com ácido tormêntico

(100 mg/kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.). A temperatura retal foi avaliada 30 min pós o tratamento com morfina e 1 h após o tratamento com ácido tórmântico ou veículo.

3.4.7. Mononeuropatia causada pela constrição parcial do nervo ciático

Para realização deste experimento foram utilizados camundongos fêmeas pesando entre 20 – 28 g, previamente anestesiadas com hidrato de cloral a 7% (10 ml/kg, i.p.). Foi feita uma incisão na coxa, o nervo ciático foi exposto próximo à trifurcação ciática e ligado em volta de aproximadamente 1/3 a 1/2 da porção dorsal, com um fio de sutura 8.0, similar o procedimento descrito em ratos por SELTZER e colaboradores (1990) e adaptado para camundongos por MALMBERG e BASBAUM (1998). Em um grupo separado de animais, o nervo ciático foi exposto mas não envolto com fio de sutura (falso operados).

Os animais foram separados em 6 grupos, sendo 3 grupos de operados e os outros 3 grupos de animais falso operados. Um grupo de animais operados foi tratado com ácido tórmântico (30 mg/kg, v.o.), outro com gabapentina (70 mg/kg, v.o.) e o terceiro recebeu veículo e serviu como controle. O tratamento com cada droga foi realizado 2 vezes ao dia (8h00 e 19h00). Os animais foram avaliados 1 h após o primeiro tratamento, a fim de caracterizar uma possível ação antinociceptiva aguda dos compostos. Para a verificação da possível ação antinociceptiva do tratamento crônico dos compostos, os animais foram avaliados aproximadamente às 14h00. Com o intuito de avaliar a atividade *per se* dos compostos, os animais falso operados receberam o mesmo tratamento e foram submetidos a mesma avaliação dos animais operados.

A alodínia mecânica foi avaliada utilizando-se monofilamentos de von Frey (filamento de 0,6 g), sendo as medidas realizadas no 1^o, 5^o, 6^o, 7^o, 10^o, 11^o, 12^o, 13^o e 14^o dias após a cirurgia.

O tratamento iniciou-se no 5^o dia, quando a neuropatia já estava instalada, e foi mantido até o 10^o dia, quando o tratamento foi interrompido com o intuito de caracterizar a duração do efeito antinociceptivo dos compostos testados. No dia anterior à cirurgia os animais foram submetidos ao teste de von Frey (filamento de 0,6 g) para caracterização da resposta basal. Apenas os animais que apresentavam uma porcentagem de resposta em torno de 20% (ver abaixo) foram selecionados. A aplicação do filamento de von Frey foi executada utilizando-se uma plataforma construída especialmente para este teste (PITCHER et al., 1999). A plataforma (70 x 40 cm), consiste de uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma.

O filamento foi aplicado na pata posterior direita, atendendo alguns critérios como: a aplicação se deu perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada da pata foi considerada quando o animal removia totalmente a pata da tela de apoio. O teste consiste na aplicação do filamento, com a duração de 1 s, por 10 vezes consecutivas. Cada retirada da pata foi considerada 10% de resposta, sendo que 10 retiradas correspondem a 100% de resposta. Foi obedecido um intervalo de 5 s entre uma aplicação e outra.

A escolha do filamento de von Frey (0.6 g) foi determinada através de uma triagem prévia. Foram aplicados os filamentos 0.07, 0.6, 1.0 e 2.0 g nos animais conforme citado acima, para caracterizar a melhor resposta basal. Com a aplicação do filamento 0.6 g os animais responderam com uma frequência de retirada em torno de 20%, uma média considerada ideal para se avaliar alodínia mecânica.

3.4.8. Modelo de nocicepção inflamatória crônica induzida por

CFA

Com o objetivo de avaliar o possível efeito do ácido tormêntico na nocicepção de origem inflamatória persistente, utilizou-se o modelo de dor inflamatória causada pelo adjuvante completo de Freund (CFA). Para tal, 20 μ l de CFA foram injetados na região plantar (i.pl.) da pata posterior direita dos camundongos. A alodínia mecânica foi avaliada 24 h após a aplicação do indutor, utilizando-se o filamento de von Frey 0,6 g. Aplicou-se o filamento como descrito no item anterior nas duas patas posteriores, a fim de investigar alodínia mecânica secundária (pata contralateral). Após a instalação da alodínia mecânica na pata ipsilateral, 1 dia após a administração do CFA, iniciou-se o tratamento com ácido tormêntico (30 mg/kg, v.o., 2 vezes ao dia) sendo que o grupo controle recebeu apenas o veículo. O efeito agudo foi investigado, tomando a primeira medida 1 h após o tratamento. Subseqüentemente, a avaliação foi feita uma vez ao dia (aproximadamente às 14h00) até o 11^o dia após a aplicação de CFA. Com o início do tratamento prolongado, os animais foram avaliados 6 h após a primeira dose do dia. O tratamento seguiu do 1^o ao 5^o dia, reiniciou no 7^o e seguiu até o 11^o dia, quando então, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e sua cavidade abdominal foi aberta. O estômago foi retirado e aberto ao longo da pequena curvatura, lavado com PBS e esticado em uma chapa de cortiça, e foi observado com auxílio de lupa com o objetivo de avaliar a presença de lesões na mucosa gástrica.

No dia anterior á aplicação de CFA os animais foram submetidos ao teste de retirada da pata, aplicando-se filamento de von Frey 0,6 g para caracterização da resposta basal.

A fim de avaliar o possível efeito antiedematogênico do ácido tormêntico, o edema das patas posteriores também foi quantificado diariamente. A espessura das patas, medida com um micrômetro (Digimatic outside micrometer, Mitutoyo), foi utilizada como índice de edema.

3.5. Drogas e soluções utilizadas

As seguintes substâncias foram utilizadas: o ácido tormêntico utilizado para os testes farmacológicos descritos nesta dissertação foi extraído da fração etanólica da casca pulverizada da *Vochysia divergens* Pohl, (Vochysiaceae). O composto foi isolado com alto grau de pureza (98%) e com rendimento de 17,5% (HESS e MONACHE, 1999) (fornecido pelo Departamento de Química da UFMS). A procedência das drogas utilizadas foram: Merck AG, (Darmstadt, Alemanha) para formaldeído e cloridrato de morfina; Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA) para o ácido L-glutâmico e CFA; Calbiochem (San Diego, USA) para a capsaicina; Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) para o hidrato de cloral; Synth (São Paulo, Brasil) para o tween 80; Neurontin (Park-Davis, Brasil) para a gabapentina; Amersham International (U.K) para o [³H]glutamato (46 Ci/mmol). Todas as soluções de drogas foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina (NaCl 0,9% v/v), com exceção da capsaicina, que foi preparada em etanol absoluto, e do ácido tormêntico que foi dissolvido em NaCl 0,9% + tween 80. O veículo que serviu de controle foi composto por NaCl 0,9% + tween 80. Tanto a concentração final de etanol como a de tween não excederam 5% e não causaram quaisquer efeitos *per se*. Nos estudos neuroquímicos, as drogas foram dissolvidas em água de Milli Q.

3.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M), exceto os valores de DI_{50} (a dose ou concentração da droga capaz de reduzir em 50% as respostas nociceptivas em relação ao valor controle) que estão apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95%. As

DI₅₀s foram calculados a partir de experimentos individuais, usando pelo menos três doses de ácido tormêntico através do método de regressão linear por intermédio do programa GraphPad Prism 1.03 software (GraphPad Software). As DI₅₀s foram calculadas mesmo quando a inibição máxima apresentada foi por volta de 50%, sabendo-se da imprecisão do resultado. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett ou pelo teste "t" de Student para amostras não-pareadas, quando apropriado. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade antinociceptiva

4.1.1. Nocicepção induzida pela formalina

De acordo com BEIRITH e colaboradores (1999), o ácido tormêntico administrado por via i.p. (3 – 60 mg/kg, 30 min) inibiu tanto a primeira quanto a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina. Utilizou-se o mesmo modelo para testar outras vias de administração. Os dados apresentados na Figura 3 mostram que o ácido tormêntico administrado pela via oral (0,3 - 100 mg/kg) causou inibição significativa tanto da fase neurogênica (0 a 5 min) quanto da fase inflamatória (15 a 30 min) da nocicepção induzida pela formalina. O valor médio calculado da DI₅₀ foi de 11 (3,59 - 35,05) mg/kg para a primeira fase. As inibições observadas, em relação ao controle, foram de $55 \pm 8\%$ na primeira fase e $50 \pm 9\%$ na segunda fase. Entretanto, o ácido tormêntico não inibiu de

maneira significativa o edema de pata associado à fase inflamatória do teste da formalina (resultados não apresentados).

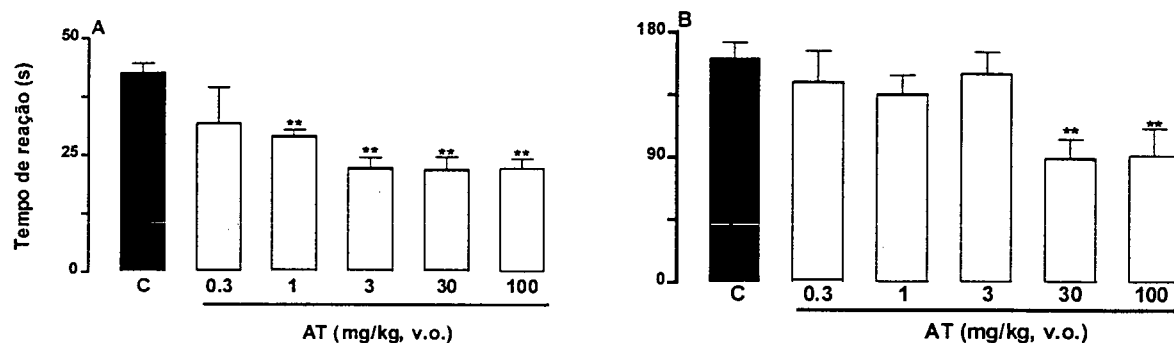


Figura 3 - Efeito antinociceptivo do ácido tornêntico (AT) (0,3 a 100 mg/kg), quando administrado por via oral 1h, em relação a primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01.

Conforme resultados mostrados na Figura 4, quando administrado por via i.t. (0,3 - 30 μ g/sítio) ou i.c.v. (0,3 - 30 μ g/sítio) 10 min antes, o ácido tornêntico não foi capaz de inibir significativamente as duas fases da dor induzida pela formalina. Da mesma forma, independente da via de administração, o ácido tornêntico não inibiu de maneira significativa o edema de pata associado à fase inflamatória do teste da formalina (resultados não apresentados).

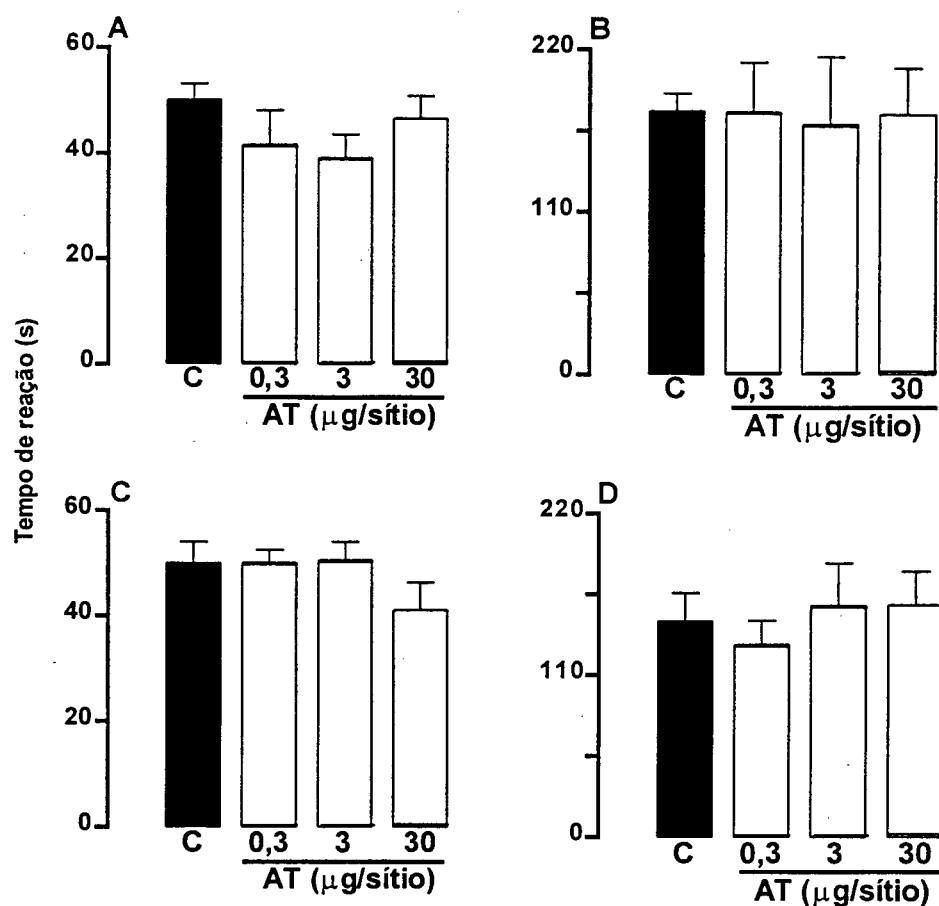


Figura 4 - Efeito do tratamento do ácido tomênico (AT) pelas vias intracerebroventricular (i.c.v.) (painéis A e B) e intratecal (i.t.) (painéis C e D), em relação a primeira (A e C) e segunda fase (B e D) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M.

4.1.2. Nocicepção induzida pela capsaicina

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que o ácido tomênico, administrado por via oral (0,1 - 3,0 mg/kg), 1 h antes, apresentou efeito antinociceptivo significativo quando avaliado no modelo da dor induzida pela capsaicina. A inibição máxima observada, em relação à resposta controle, foi de $46 \pm 11\%$.

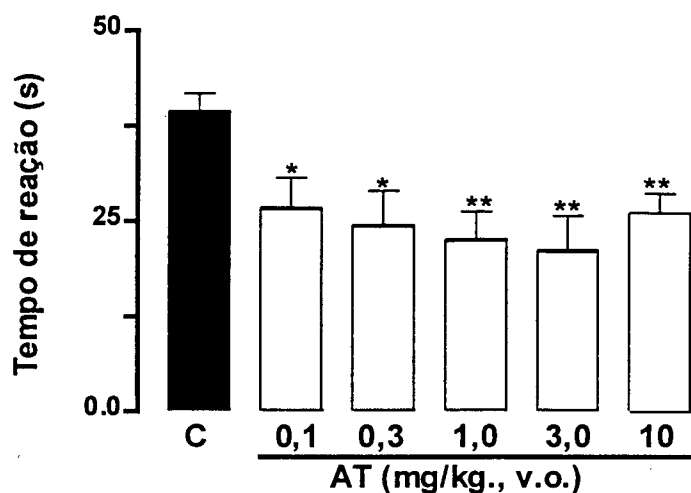


Figura 5 - Efeito antinociceptivo causado pelo ácido tormêntico (AT), quando administrado pela via oral, 1 h antes, em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.3. Nocicepção e edema de pata induzidos pela injeção intraplantar de glutamato

Os resultados da Figura 6 demonstram que o ácido tormêntico foi capaz de inibir, de maneira proporcional a dose administrada, a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato ($30,0 \mu\text{mol}/20 \mu\text{l}$) em camundongos. Esta atividade antinociceptiva foi observada quando os animais foram tratados com ácido tormêntico pelas vias i.p. (1 - 200 mg/kg) ou oral (1 - 30 mg/kg), 30 min e 1 h antes da injeção intraplantar de glutamato, respectivamente, ou ainda pela via i.pl. (10 - 100 $\mu\text{g}/\text{pata}$) co-injetado em associação com o glutamato (Figura 5 A, B e C respectivamente). As inibições observadas, em relação aos grupos controle, foram $76 \pm 7\%$, $65 \pm 7\%$, $46 \pm 8\%$ respectivamente. Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{s}}$ foram 11,85 (6,45 - 21,78) e 7,38 (3,91 - 13,95) para as vias i.p. e oral, respectivamente.

Independente da via de administração utilizada, o ácido tormêntico não apresentou efeito significativo sobre o edema de pata associado à injeção intraplantar de glutamato, (resultados não apresentados).

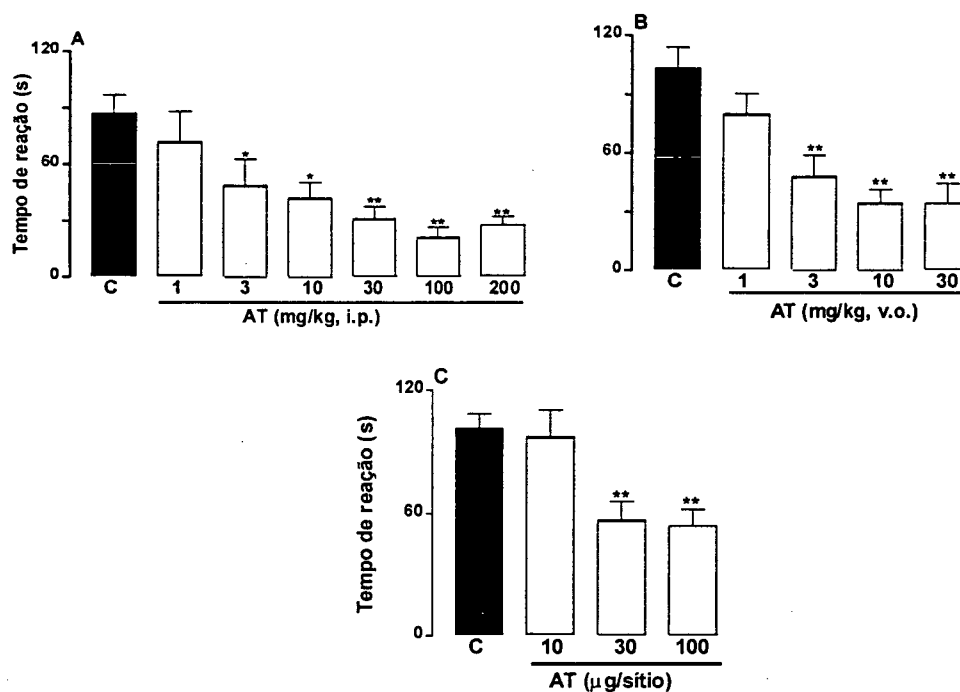


Figura 6 – Efeito do ácido tormêntico (AT) administrado por via intraperitoneal (i.p., 30 min A), oral (v.o., 1h B) ou intraplantar (i.pl., C), em relação a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.3.1. Efeito do ácido tormêntico sobre a união específica (*binding*) de [³H]glutamato em córtex de camundongos

Os resultados representados na Figura 7 mostram que o ácido tormêntico (19,8 e 198,40 μM) não causou inibição significativa da união específica (*binding*) do [³H]glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos.

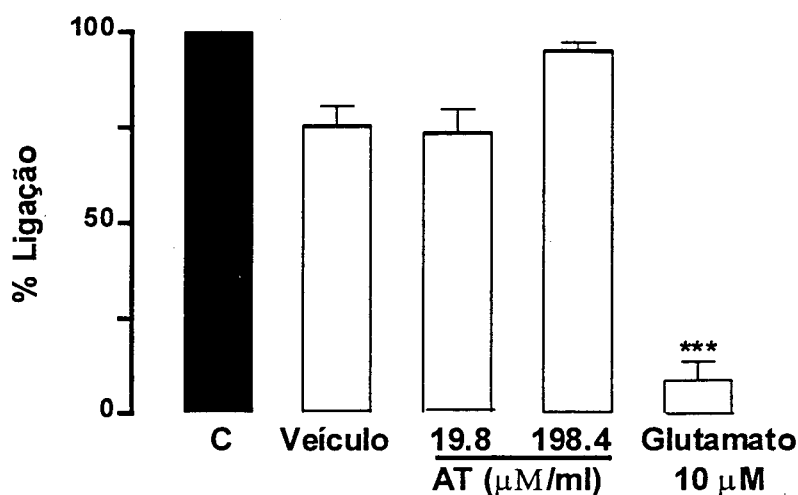


Figura 7 – Efeito do ácido tormêntico (AT) sobre a união específica (*binding*) de $[^3\text{H}]$ glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos, utilizando concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido tormêntico. Cada barra representa a média de três experimentos independentes (cada experimento realizado em triplicata) e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, *** $P < 0,001$.

4.1.4. Teste da placa quente

O tratamento dos animais com ácido tormêntico (10 – 100 mg/kg, v.o.) 1 h antes, causou efeito antinociceptivo significativo, verificado através do aumento do tempo de latência dos animais sobre a placa aquecida, quando avaliado 1, 2, 3 e 4 h após o tratamento conforme mostra a Figura 8. As doses de 30 e 100 mg/kg apresentaram aumento do tempo de latência já na primeira h, sendo que esse efeito durou até 3 h, com um pico de ação 2 h após tratamento.

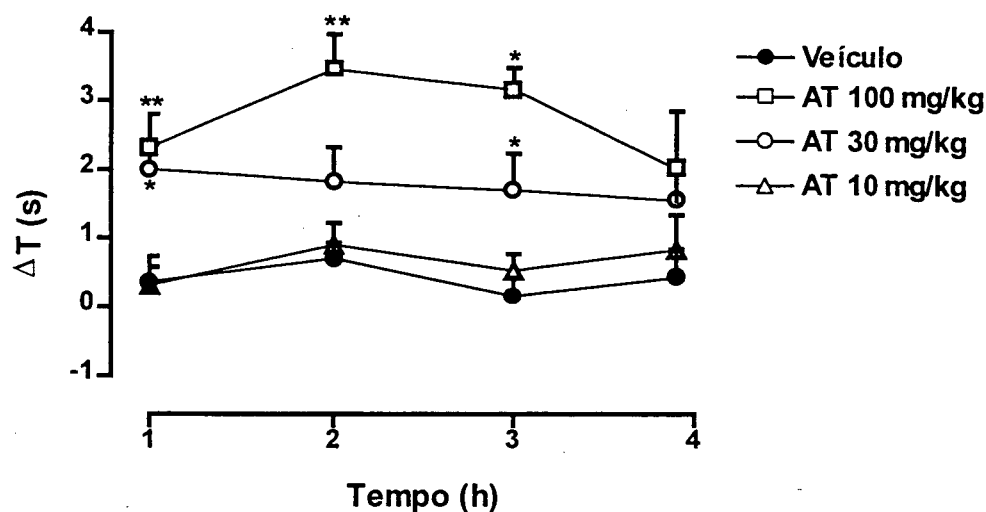


Figura 8 – Curvas tempo e dose resposta para o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico (AT), quando administrado pela via oral, em relação a nocicepção térmica no modelo da placa quente em camundongos. (●: controle (veículo); □: AT 100 mg/kg; ○: AT 30 mg/kg; △: AT 10 mg/kg). Cada grupo representa a média de 4 - 6 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.5. Medida do desempenho motor

O ácido tormêntico, na dose de 100 mg/kg (maior dose testada, por via oral, nos modelos de dor), administrado por v.o. 1 h antes do teste, não alterou significativamente a resposta motora dos animais quando avaliado no modelo do *rota rod* (dados não mostrados). O tempo que os animais controle permaneceram no aparelho foi de $57,14 \pm 0,73$ s, enquanto que o tempo que os animais tratados com ácido tormêntico permaneceram foi de $57,16 \pm 0,74$ s.

Além disso, ácido tormêntico (30 mg/kg) e a gabapentina (70 mg/kg), administrados por v.o. 1 h antes, não alteram significativamente a resposta dos animais no teste do campo aberto quando comparados aos animais do grupo controle. Porém, a gabapentina na dose de 100 mg/kg, v.o. interferiu tanto no número de cruzamentos quanto na capacidade exploratória dos animais (Figura 9).

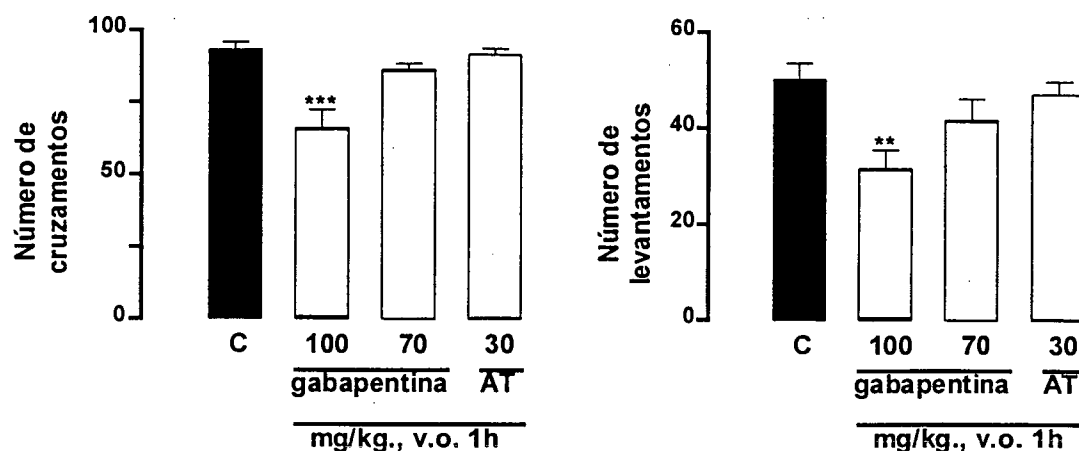


Figura 9 – Efeito do tratamento dos animais com ácido tórmântico (AT) (30 mg/kg), gabapentina (70 ou 100 mg/kg) ou veículo no modelo do campo aberto. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.1.6. Temperatura corporal

Os animais tratados com morfina (5 mg/kg, s.c. 30 min antes) tiveram uma significativa redução na temperatura corporal. Porém nos animais tratados com ácido tórmântico (100 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.), 1 h antes, não foram observadas alterações significativas da temperatura corporal (Figura 10).

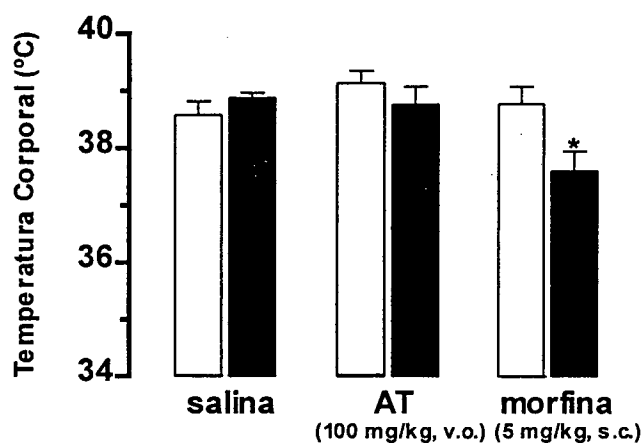


Figura 10 – Efeito do tratamento com ácido tórmântico (AT) (v.o.) ou morfina (s.c.), na temperatura retal de camundongos. As barras brancas representam os valores antes do tratamento, e as barras pretas pós tratamento. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do pré tratamento, * $P < 0,05$.

4.1.7. Mononeuropatia causada pela constrição parcial do nervo ciático

Conforme mostra a Figura 12, a ligação parcial do nervo ciático produziu aumento na frequência de retirada (alodinia mecânica) da pata ipsilateral, avaliada pela aplicação do filamento de von Frey 0,6 g. Os animais operados apresentaram sinais de alodinia a partir do 5º dia após a cirurgia, atingiram a resposta máxima no 7º dia e a sensibilidade permaneceu aumentada por mais de 14 dias. A cirurgia não alterou significativamente tanto a frequência da pata contralateral dos animais operados (dados não mostrados) quanto a frequência da pata ipsilateral (Figura 12) e contralateral dos animais falso operados (dados não mostrados). O tratamento agudo (1 h) com gabapentina (70 mg/kg), mas não com ácido tormêntico (30 mg/kg), diminuiu significativamente a resposta de retirada da pata ipsilateral nos animais com lesão no nervo ciático (Figura 11). Por outro lado, o tratamento prolongado por via oral com ácido tormêntico (30 mg/kg, 2 vezes ao dia), diminuiu significativamente a resposta de retirada da pata ipsilateral nos animais com ligação parcial do nervo ciático, observado 3 dias após o início do tratamento, efeito que se manteve por até 3 dias após a sua retirada (Figura 12). A gabapentina administrada por via oral (70 mg/kg, 2 vezes ao dia) apresentou um perfil semelhante ao ácido tormêntico, porém a duração do efeito após retirada da droga foi menor. A inibição observada foi de $91 \pm 19\%$ para o ácido tormêntico e $76 \pm 13\%$ para a gabapentina. O mesmo tratamento não alterou a resposta de retirada da pata dos animais falso operados, demonstrando que ambas as drogas não alteram o limiar mecânico dos animais (dados não mostrados).

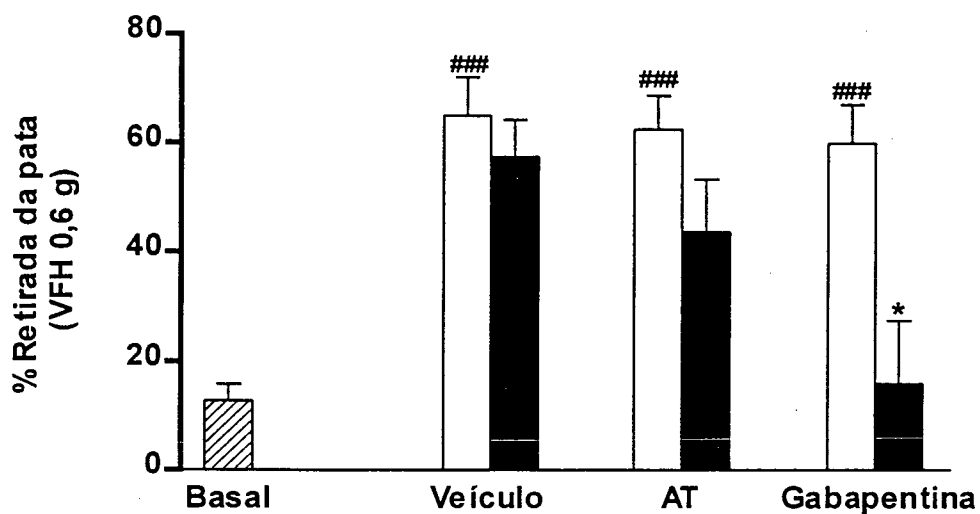


Figura 11 – Efeito do tratamento agudo por via oral com ácido tormêntico (AT) ou gabapentina na alodínia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático. O tratamento agudo iniciou-se no 5º dia após a cirurgia quando a alodínia mecânica já estava instalada. Os valores basais foram obtidos no dia anterior a cirurgia. As barras brancas representam os valores antes do tratamento, enquanto as barras pretas 1 h após o tratamento. Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do pré tratamento, * $P < 0,05$; difere significativamente do grupo de falso operados, $###P < 0.001$.

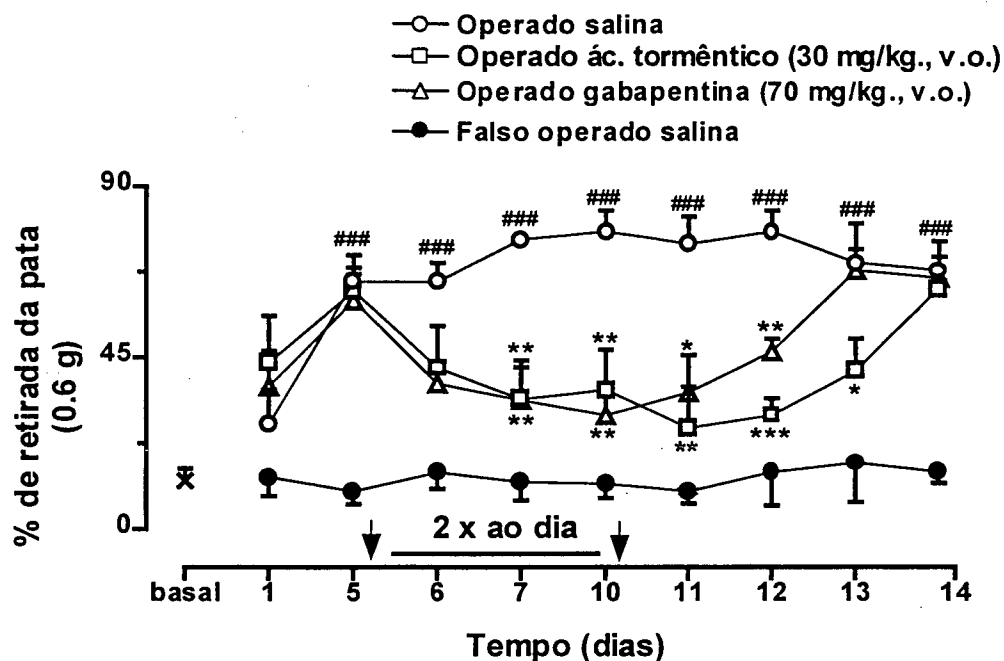


Figura 12 – Curva tempo resposta para o efeito antinociceptivo após tratamento por via oral com ácido tormêntico (AT) ou com gabapentina na alodínia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático. Os valores basais foram obtidos no dia anterior à cirurgia. ●: falso operados (NaCl 0,9% + Tween 80); ○: operados controle (veículo); □: AT (30 mg/kg); △: gabapentina (70 mg/kg). Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; difere significativamente do grupo de falso operados, ### $P < 0,001$.

4.1.8. Modelo de nociceção inflamatória crônica induzida por

CFA

A injeção de CFA aumentou a frequência de retirada da pata após aplicação do filamento de von Frey tanto na pata ipsilateral à injeção, como na contralateral, porém com perfil diferente (Figura 13 A e B). A alodínia mecânica na pata tratada (ipsilateral) foi notada a partir do 1º dia após a aplicação de CFA e continuou aumentada até o 11º dia. Na pata contralateral a alodínia mecânica apareceu no 2º dia, não foi observada no 3º, 4º e 5º dia, porém retornou no 6º dia e permaneceu aumentada até o 11º dia após a injeção de CFA. O tratamento agudo com ácido tormêntico por via oral (30 mg/kg) 1 h antes, não foi eficaz em inibir de forma significativa a alodínia mecânica (dados não mostrados). No entanto, o tratamento prolongado por via oral com

ácido tormêntico (30 mg/kg, 2 vezes ao dia), diminuiu significativamente a alodínia mecânica a partir do 2º dia do tratamento e atingiu inibição máxima de $82 \pm 9\%$ no 4º dia. A suspensão do tratamento com ácido tormêntico (30 mg/kg, 2 vezes ao dia) no 5º dia após a aplicação de CFA permitiu restabelecer a alodínia mecânica na pata ipsilateral. O tratamento com ácido tormêntico iniciado no 7º após CFA e mantido até o 11º dia novamente causou marcada ação antinociceptiva cuja inibição máxima já foi atingida no 2º dia na pata contralateral ($100 \pm 11\%$) e no 3º dia na pata ipsilateral ($82 \pm 7\%$), após o retorno do tratamento (Figura 13). O mesmo tratamento não inibiu de maneira significativa a formação do edema de pata induzido pelo CFA. No 11º dia os animais foram sacrificados e examinados quanto a presença de irritação gástrica e/ou úlcera, sendo que não foi detectado nenhum sinal de lesão no trato gastrointestinal (resultados não apresentados).

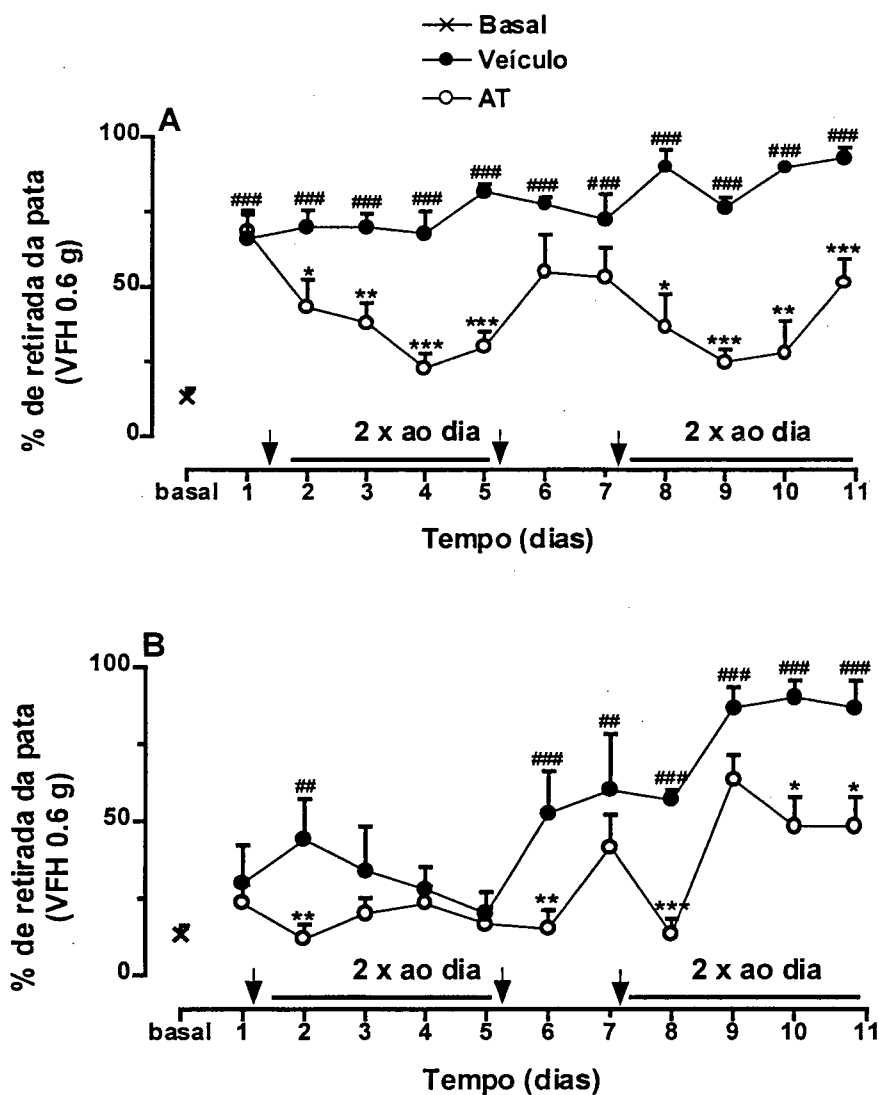


Figura 13 –Efeito antinociceptivo dependente do tempo para o efeito antinociceptivo causado pelo tratamento por via oral com ácido tormêntico (AT) na alodinia mecânica induzida pelo CFA na pata ipsilateral (A) e na pata contralateral (B). Os valores basais foram obtidos no dia anterior a aplicação de CFA. ●: controle (Veículo); ○: tratados com (AT 30 mg/kg). Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; difere significativamente da medida basal,### $P < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que o tratamento agudo sistêmico dos animais com ácido tormêntico mostrou-se efetivo em inibir a nocicepção de origem neurogênica causada tanto pela administração de formalina como pela administração de capsaicina em camundongos. Em adição, o ácido tormêntico administrado pela via sistêmica ou local foi efetivo em inibir a nocicepção induzida pelo glutamato. Além disso, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento prolongado por via oral com o ácido tormêntico reduziu de maneira significativa a nocicepção persistente causada pela constrição parcial do nervo ciático (dor neuropática) e a dor inflamatória persistente causada pela administração do adjuvante completo de Freund em camundongos. Esses resultados são relevantes considerando a atual falta de alternativas terapêuticas para o tratamento da nocicepção persistente, especialmente nas neuropatias.

Quando testado no modelo da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, o ácido tormêntico, administrado pela via oral, inibiu de maneira significativa as duas fases de nocicepção induzida pela formalina. O modelo da formalina é caracterizado por dois tipos distintos de nocicepção. Diversos autores têm proposto que a primeira fase (fase neurogênica) da nocicepção causada pela formalina envolve a estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985), principalmente das fibras aferentes do tipo C e também, em parte, das fibras A δ (HEAPY et al., 1987). A formalina também é capaz de degranular mastócitos causando a liberação de histamina e serotonina (FUJIMAKI et al., 1992). Estudos recentes realizados por PARADA e colaboradores (2001), com o uso de antagonistas específicos, mostraram a participação de receptores H₁ para a histamina tanto na primeira quanto na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, enquanto os receptores H₂ não parecem estar envolvidos neste modelo de dor. Além disso, animais com deleção gênica dos receptores H₁ também confirmam o envolvimento desses receptores nas duas fases da dor

induzida pela formalina (MOBARAKEH et al., 2000). No que diz respeito a participação da serotonina na nocicepção causada pela formalina, existem evidências indicando que os receptores do tipo 5-HT_{4/3} possam estar envolvidos tanto na primeira quanto na segunda fase desse modelo de nocicepção, enquanto que os receptores 5-HT_{1A} parecem ter participação apenas na segunda fase. A ativação direta do nociceptor por histamina e serotonina libera neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (SANTOS e CALIXTO, 1997a; CAO et al., 1998), além de aminoácidos excitatórios como o glutamato e o aspartato (OMOTE et al., 1998). Estes mediadores químicos parecem ser os responsáveis pela nocicepção transitória observada entre 0 e 5 min após a injeção de formalina. A entrada de estímulos nociceptivos no SNC ativa as vias descendentes inibitórias analgésicas (como as opioidérgicas). Comportamentalmente, pode ser observada uma interfase entre 5 a 15 min após a aplicação de formalina, período no qual praticamente não é observada resposta nociceptiva. Por outro lado, a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios e produtos da degranulação de mastócito durante a primeira fase causa extravasamento plasmático, vasodilatação de capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, mastócitos e macrófagos. Este processo produz liberação de vários outros mediadores do processo inflamatório, tais como as cininas, prostaglandinas, ATP, NGF, citocinas dentre outros. Em conjunto, estas substâncias interagem com receptores específicos ativando os nociceptores e as células do sistema imune. Este processo produz sensibilização das vias periféricas e centrais (espinhais e supra-espinhais) de condução da dor, característica da segunda fase da nocicepção (fase inflamatória), observada de 15 a 30 min após a aplicação de formalina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; CORRÊA e CALIXTO 1993; TJØLSEN e HOLE, 1997).

O ácido tormêntico, administrado pela via oral, apresentou praticamente a mesma eficácia para as duas fases da resposta álgica do modelo nocicepção induzida pela formalina,

enquanto doses menores inibiram significativamente a fase neurogênica, apenas doses maiores foram capazes de inibir significativamente a fase inflamatória neste modelo. Contudo, o ácido tormêntico, administrado centralmente através das vias intratecal ou intracerebroventricular, foi ineficaz em inibir quaisquer das duas fases de nocicepção induzidas da formalina, sugerindo que o sítio envolvido na sua ação antinociceptiva está principalmente relacionado à periferia. Além disto, a ausência de efeito anti-edematogênico no teste da formalina indica que o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico certamente não está relacionado com um possível efeito anti-inflamatório generalizado.

Devido a eficácia do ácido tormêntico em inibir a primeira fase do teste da formalina, julgou-se oportuno avaliar a ação deste composto em um modelo mais específico de nocicepção de origem neurogênica, que é o teste da capsaicina. A nocicepção induzida pela capsaicina é similar à primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, isto é, provavelmente corresponde à estimulação direta dos nociceptores periféricos. A capsaicina é o princípio pungente presente em várias espécies de *Capsicum* (pimenta vermelha) que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (JANCSÓ et al., 1981; SAKURADA et al., 1992). Recentemente, foi demonstrado que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, denominados de receptores vanilóides do tipo 1 (VR-1). Esses receptores estão seletivamente expressos em fibras sensoriais nociceptivas, principalmente as do tipo C (CATERINA et al., 1997). Estudos realizados em animais com deleção gênica do receptor VR-1 demonstraram que esse receptor é essencial para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica que acompanha os processos inflamatórios (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). De fato, o calor (acima de 43 °C) e ambiente ácido (pH 6) ativam os receptores vanilóides (para revisão JULIUS e BAUSBAUM, 2001). A capsaicina é uma molécula hidrofóbica que possui similaridade estrutural com vários segundos mensageiros lipídicos. Relatos da literatura

demonstram que a interação de mediadores envolvidos nos processos inflamatórios (como a bradicinina, NGF e o ATP) com seus receptores produz mensageiros lipídicos (como anandamida e produtos da lipooxigenase), que por sua vez ativam receptores VR-1 (HWANG et al., 2000; PREMKUMAR e AHERM, 2000; CHUANG et al., 2001; TOMINAGA et al., 2001). Além disso, as proteínas quinases como a PKC e a PKA fosforilam o receptor VR-1 e aumentam a afinidade por ligantes endógenos por seus receptores, como é o caso da anandamida (LOPSHIRE e NICOL, 1998; PREMKUMAR e AHERM, 2000). Uma vez ativados, os receptores vanilóides causam influxo de cátions (principalmente Ca^{2+} e Na^{+}) que, em consequência, produzem despolarização e excitação dos neurônios levando à liberação de neuropeptídeos (GAMSE et al., 1979; SZOLCSÁNYI, 1985; LEMBECK, 1988; OH et al., 1996; CATERINA et al., 1997; SANTOS e CALIXTO, 1997a; b; SZALLASI e BLUMBERG, 1999).

Após a irritação violenta inicial, a exposição prolongada ou a aplicação de altas concentrações de capsaicina em humanos e animais causa insensibilidade a um estímulo nocivo posterior. Este processo de dessensibilização permanece por semanas ou meses após a administração de capsaicina (para revisão ver: SZALLASI e BLUMBERG, 1999). Por este motivo, a capsaicina tem sido utilizada clinicamente como analgésico coadjuvante tópico em vários estados de dor crônica (SZALLASI e BLUMBERG, 1999), apesar do desconforto produzido pela primeira exposição à droga. Diante dessas evidências, foram produzidos vários análogos estruturais da capsaicina que possuem efeitos analgésicos sem possuir efeito irritante (por exemplo o olvanil). A síntese deste tipo de molécula é promissora para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas terapeuticamente relevantes (para revisão ver SZALLASI e BLUMBERG 1999; CALIXTO et al., 2001).

O ácido tormêntico administrado pela via oral causou inibição significativa da nocicepção induzida pela capsaicina, com eficácia semelhante a aquela apresentada no modelo de nocicepção induzida pela formalina. Esses resultados são relevantes, já que a maioria das

drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINES) testadas é ineficaz em prevenir a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina (SHIBATA et al., 1989; MALMBERG e YAKSH, 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; VAZ et al., 1996; SANTOS et al., 1998).

No teste da placa quente, um estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem informação nociceptiva aguda a regiões específicas no SNC, produzindo uma resposta nocifensiva organizada (MOGIL et al., 1999). Por este motivo a placa quente é um dos métodos mais utilizados no estudo de drogas analgésicas, principalmente aquelas com ação no SNC tais como os opióides e os anestésicos gerais (WALKER et al., 1999). Estudos recentes sugerem a participação de mecanismos periféricos da transmissão da resposta nociceptiva térmica. Assim, além do VR-1, outros receptores como o VRL-1 (receptor relacionado ao VR-1) e o SIC (receptor inativado pelo estiramento) foram clonados e identificados como proteínas termoreceptores (para revisão ver: REICHLING e LEVINE, 2000). A ativação destas proteínas causa influxo de íons em neurônios sensoriais, iniciando o processo de condução da informação nociceptiva térmica. Animais com deleção gênica para o receptor VR-1 demonstram défices na transmissão de estímulos térmicos avaliados *in vivo* e *in vitro* (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). De fato, a deleção gênica do VR-1 ou a dessensibilização causada pelo tratamento agudo com capsaicina produz aumento na latência dos animais ao estímulo da placa quente (GAMSE, 1982; CATERINA et al., 2000). Porém, os animais nocautes para o receptor VR-1 continuam tendo sua sensibilidade mecânica inalterada, sugerindo que a transmissão dos estímulos térmicos e mecânicos agudos possuem vias de transmissão diferentes. De maneira interessante, o ácido tormêntico mostrou efeito antinociceptivo significativo e duradouro no teste da placa quente. Convém lembrar que o ácido tormêntico não alterou o limiar do estímulo mecânico dos animais avaliados pelo filamento de von Frey. Estes dados estão de acordo com os resultados observados na nocicepção causada pela capsaicina e sugerem que o ácido tormêntico interfere

seletivamente com a transmissão da informação nociceptiva gerada por fibras que expressam o receptor VR1 e são sensíveis à capsaicina.

Os principais mediadores liberados durante a dor neurogênica são o glutamato e o aspartato. Também tem sido demonstrado que esses aminoácidos são liberados após a injeção intraplantar de formalina (OMOTE et al., 1998). O glutamato atua em receptores próprios do tipo NMDA e não-NMDA. Os receptores chamados de não-NMDA subdividem-se em metabotrópico, cainato e AMPA. Enquanto que os receptores NMDA, cainato e AMPA constituem canais iônicos, os receptores metabotrópicos são acoplados a proteínas G (NAKANISHI e MASU, 1994; DICKENSON, 1995; HUDSPITH, 1997). Todos os receptores glutamatérgicos parecem estar envolvidos na transmissão da nocicepção, tanto central como periférica (ZHOU et al., 1996; LUFTY et al., 1997; BOXALL et al., 1998; PROCTER et al., 1998; ZAHN et al., 1998). De fato, a administração intratecal ou intraplantar de glutamato causa nocicepção em camundongos e ratos (RAIGORODSKY e URCA, 1987; BEIRITH et al., 2002) e a administração periférica de antagonistas glutamatérgicos pode prevenir esse efeito, bem como a hiperalgesia e a inflamação induzida pela injeção intraplantar de formalina (CARLTON et al., 1995; JACKSON et al., 1995; ZHOU et al., 1996). Na periferia, o efeito nociceptivo do glutamato parece ser mediado tanto por receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos. Além disto, o glutamato também produz edema de pata que é mediado somente por receptores AMPA, cainato e pela produção de óxido nítrico (BEIRITH et al., 2002). De maneira extremamente eficaz, quando comparado aos outros modelos testados, o ácido tormêntico administrado pela vias intraperitoneal, oral e intraplantar inibiu a nocicepção, mas não o edema, causados pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Diferentemente de grande parte das drogas analgésicas utilizadas na clínica, o ácido tormêntico apresentou praticamente a mesma potência quando administrado por via oral e por via intraperitoneal, sugerindo que a sua biodisponibilidade é praticamente a mesma quando

administrado por ambas as vias. A biodisponibilidade é o termo utilizado para indicar a quantidade de uma droga que atinge seu local de ação ou um líquido biológico a partir do qual o fármaco tem acesso a seu local de ação. Sabe-se que, os fármacos presentes no trato gastrointestinal podem sofrer metabolização pelas enzimas da mucosa, pela flora intestinal ou pelo fígado, antes de terem acesso à circulação sistêmica (BENET et al., 1996). Quando a capacidade metabólica ou excretora do fígado para uma determinada droga for grande, a biodisponibilidade diminui consideravelmente. Contudo, os resultados do presente estudo sugerem que o ácido tormêntico parece não sofrer metabolização que interfira com suas propriedades antinociceptivas. Porém, estudos farmacocinéticos específicos deverão ser realizados para avaliar melhor esta possibilidade. Tendo em vista que, o uso da via oral em humanos possui algumas vantagens tais como segurança, conveniência e economia (BENET et al., 1996), optou-se somente pela administração oral para testar a atividade do ácido tormêntico em outros modelos de nocicepção.

A eficácia antinociceptiva do ácido tormêntico sobre a nocicepção induzida pelo glutamato fez com que se investigasse a sua possível interação direta deste composto com os receptores glutamatérgicos utilizando a técnica de união específica (*binding*) em membranas de córtex cerebral. Porém, nas condições avaliadas, o ácido tormêntico não foi capaz de inibir a união do [³H]-glutamato com seus receptores em membranas de córtex cerebral de camundongos. Esses resultados sugerem que a atividade antinociceptiva do ácido tormêntico não parece estar diretamente associada com a inibição de receptores glutamatérgicos. Por outro lado, o ácido tormêntico poderia estar inibindo vias de sinalização intracelulares como influxo de íons, produção de óxido nítrico, ativação de proteínas quinases e outras ativadas pelos receptores glutamatérgicos e/ou outros neurotransmissores. Sabe-se que estímulos nociceptivos não lesivos causam ativação de receptores ionotrópicos AMPA e cainato que provocam o influxo de íons sódio no neurônio sensorial, produzindo uma sensação de dor transitória (fisiológica)

(para revisão ver HUDSPITH, 1997, WOOLF e SALTER, 2000). Ao contrário, estímulos nociceptivos lesivos causam ativações repetidas nos receptores AMPA e cainato levando ao desbloqueio de Mg^{+2} nos receptores NMDA. A ativação dos receptores NMDA permite a entrada de Ca^{+2} e promove uma despolarização sustentada da célula. A elevação da concentração de Ca^{+2} intracelular no neurônio sensorial pode ativar enzimas como a óxido nítrico sintase e a fosfolipase A_2 , além de proteínas quinases como a PKA, PKC e calmodulina quinase II. Além disso, a ativação de receptores metabotrópicos resulta na formação de inositol tri-fosfato e diacilglicerol, contribuindo também para o aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular e ativação de proteína quinase C. Além disso, a ativação dessas quinases leva a fosforilação de receptores de membrana acoplados a canais iônicos, alterando a excitabilidade neuronal. Além disso, estas quinases podem ativar fatores de transcrição e alterar a expressão gênica em neurônios sensoriais, produzindo as mudanças persistentes na sensibilidade que são observadas em condições de dor crônica (WOOLF e COSTIGAN, 1999; JI e WOOLF, 2001).

Existem evidências de que a ativação de receptores AMPA e cainato e a produção de óxido nítrico medeiam o edema de pata causado pelo glutamato. Assim, a ausência de efeito anti-edematogênico do ácido tormêntico poderia sugerir sua interação principalmente com mecanismos transduccionais, como por exemplo as proteínas quinases. Também deve-se levar em conta que o ácido tormêntico pertence a classe dos ursanos dos triterpenos pentacíclicos, conhecidos por inibirem *in vitro* de maneira seletiva algumas proteínas quinases como a PKA, PKC e tirosina quinase, mas no entanto não alteram a atividade da quinase da miosina de cadeia leve (MLCK) (HASMEDA et al., 1999; HOLLOSY et al., 2000). Estudos específicos deverão ser realizados para verificar se o ácido tormêntico possui efeito semelhante aos outros compostos da sua classe química e se este efeito pode ser relevante para as respostas observadas *in vivo*.

Com a finalidade de analisar a possível interação do ácido tormêntico com essas vias de transdução, foram utilizados dois modelos de dor persistente, cujos mecanismos parecem

envolver a participação dessas quinases. Entre os modelos de nocicepção persistente utilizados em animais de laboratório estão os modelos de ligação parcial do nervo ciático e a nocicepção persistente causada pela aplicação intraplantar de CFA. Tanto a dor neuropática quanto a dor inflamatória provocam hipersensibilidade no local do dano tecidual e também em tecidos adjacentes normais dando origem aos fenômenos conhecidos como hiperalgesia e alodínia. Considerando-se que a alodínia mecânica (dor patológica e persistente que é produzida por estímulos mecânicos anteriormente inócuos) é um dos sintomas clínicos mais comuns presente na dor de origem neuropática, investigou-se no presente estudo a possível propriedade antialodínica do ácido tormêntico no modelo de dor neuropática como também no modelo de nocicepção inflamatória persistente.

O tratamento com o ácido tormêntico nesses modelos de nocicepção persistente mostrou resultados muito mais interessantes do que os resultados observados nos modelos de nocicepção aguda. Com a finalidade de comparar as ações do ácido tormêntico com uma droga atualmente utilizada na clínica para o tratamento da dor neuropática, experimentos paralelos foram realizados no modelo de dor neuropática utilizando a gabapentina. A gabapentina é uma droga anticonvulsivante de uso relativamente recente, que mostrou ser efetiva em aliviar a nocicepção neuropática em modelos animais e também é usada na clínica para o tratamento da dor neuropática em humanos (ROSNER et al., 1996; HUNTER et al., 1997; PATEL et al., 2001). Os nossos resultados mostram que, ao contrário da gabapentina, o ácido tormêntico é desprovido de efeito agudo significativo quando avaliado na alodínia mecânica. Contudo, após tratamento repetido, duas vezes ao dia por via oral, o ácido tormêntico apresentou um perfil anti-alodínico semelhante ao da gabapentina, porém, a dose necessária para obter a mesma eficácia foi 2,3 vezes menor. Além disso, o efeito anti-alodínico do ácido tormêntico foi mais duradouro que o efeito da gabapentina, quando avaliado após a interrupção da administração dessas drogas.

Nossos dados também indicam que a gabapentina, administrada agudamente na dose de 100 mg/kg v.o., diminui a resposta ao estímulo mecânico a valores abaixo do limiar basal dos animais (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por MIKI e colaboradores (2001) quando avaliaram a mesma dose de gabapentina em modelos de neuropatia provocada tanto por lesão nervosa (constricção do nervo ciático) como por indução de neuropatia diabética (por estreptozotocina), em ratos. Estes resultados sugerem, portanto, que a gabapentina não apresenta apenas um efeito antinociceptivo, mas também induz hipoalgesia mecânica por diminuir a resposta ao estímulo mecânico abaixo dos valores basais.

A alodínia é uma sensação dolorosa provocada por estímulos não nocivos e que apresenta pelo menos duas causas: a reorganização anatômica das fibras A β e a diminuição do limiar mecânico dos nociceptores localizados periféricamente. A lesão nervosa produz um neuroma. Na região do neuroma e também ao longo do nervo acumulam-se canais de sódio produzidos no soma (localizado em gânglios das raízes dorsais) que deveriam ser transportados até as terminações periféricas. Existem dois tipos de canais de sódio, os que são sensíveis e os resistentes à tetrodotoxina (TTXr), e ambos são encontrados no neurônio sensorial. Este acúmulo de canais de sódio produz descargas ectópicas que parecem ser muito importantes para a produção da dor neuropática. De fato, tem sido observado aumento na expressão dos TTXr durante a dor neuropática e a inibição da expressão destes canais (por oligonucleotídeos antisense - ODN) foi capaz de reduzir os sintomas da dor neuropática em animais (LAI et al., 2002). Também é conhecido que as correntes mediadas pelos TTXr são ativadas pela prostaglandina E₂, um efeito que também envolve a participação da via da proteína quinase A (PKA) (BEVAN e STOREY, 2002). Assim, animais com deleção gênica da subunidade catalítica da PKA são hipoalgésicos em modelos de dor neuropática (MALMBERG et al., 1997a). A estimulação persistente causada pela lesão tecidual promove a liberação de glutamato e de

neuropeptídeos na medula espinhal. Tal fato produz plasticidade neuronal, um fenômeno importante no estabelecimento da dor neuropática (WOOLF e MANNION, 1999).

A injeção intraplantar de CFA (composto por bactérias mortas de *Mycobacterium tuberculosis*) em animais constitui um modelo de dor inflamatória crônica que tem similaridade com doenças crônicas humanas tais como a artrite reumatóide e as inflamações severas nas articulações (TJØLSEN e HOLE, 1997). Em consequência, a injeção de CFA causa hiperalgesia e alodínia observadas tanto na pata ipsilateral, quanto na pata contralateral. Este efeito é mediado pela sensibilização local do nociceptor e por mecanismos sistêmicos neuronais (como a sensibilização central) e imunes (como o aumento dos níveis locais e séricos de citocinas) (WOOLF et al., 1997; SAMAD et al., 2001).

Os resultados do presente trabalho confirmam essas observações e mostram que a injeção intraplantar de CFA em camundongos induziu nocicepção e edema na pata ipsilateral e em menor escala na pata contralateral. Na pata ipsilateral a alodínia mecânica foi detectada já no primeiro dia após a aplicação de CFA e permaneceu aumentada até 11 dias após a aplicação. Por outro lado, a alodínia observada na pata contralateral teve um padrão temporal diferente, foi detectada a partir do segundo e sexto dias e permaneceu aumentada até 11 dias após a aplicação de CFA. O tratamento agudo dos animais com ácido tormêntico, da mesma forma como observado no modelo de constrição parcial do nervo ciático em camundongos, não foi eficaz em diminuir a resposta alodínica mecânica. Porém, o tratamento prolongado por via oral com o ácido tormêntico duas vezes ao dia, foi bastante efetivo em inibir a alodínia causada pela injeção de CFA, sendo eficaz tanto quando avaliado na pata ipsilateral como na pata contralateral. O início da atividade anti-alodínica após a injeção do ácido tormêntico foi notada, em ambas as patas, a partir do segundo dia de tratamento e o pico de ação na pata ipsilateral foi atingido no quarto dia após o início do tratamento. Além disto, uma observação interessante foi a duração de sua ação antinociceptiva após a interrupção do tratamento, uma ação já observada

no modelo de dor neuropática por constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Esses resultados, analisados em conjunto, sugerem uma possível ação do ácido tormêntico na terapia da dor inflamatória. Outra característica interessante observada no presente estudo é que, ao contrário das drogas opióides, as ações antinociceptivas do ácido tormêntico não foram associadas com o aparecimento do fenômeno de tolerância. Tal observação está baseada no fato de que um segundo tratamento com ácido tormêntico, na mesma dose e esquema de tratamento, iniciado após a interrupção de sua administração, produziu o mesmo perfil de ação antinociceptiva quando avaliado na nocicepção causada pela injeção de CFA.

Inúmeras evidências experimentais indicam que a nocicepção persistente decorrente de lesão tecidual e/ou a observada nos casos de processos inflamatórios envolve mecanismos complexos, muitas vezes relacionadas com a alteração do padrão de expressão de genes expressos constitutivamente ou ainda indução de genes que não são expressos normalmente (WOOLF e COSTIGAN, 1999). Estímulos nociceptivos sustentados induzem mudanças transcricionais em neurônios nociceptivos centrais, que são parcialmente mediados pela ativação de cascatas de várias quinases como a da quinase ativada por mitógeno (MAPK), e a estimulação de fatores de transcrição como o CREB (JI e WOOLF, 2001). Estas cascatas causam mudanças nos neurônios do corno da raiz dorsal da medula espinhal levando a mudanças neurofisiológicas (SCHWARTZMAN et al., 2001). Além dos mecanismos neurais, pode ocorrer também a ativação de mecanismos imunes. Recentemente, SAMAD e colaboradores (2001) demonstraram aumento dos níveis de citocinas, como a interleucina 1 β (IL-1 β), tanto local como sistemicamente, inclusive no sistema nervoso central. A IL-1 β é capaz de induzir a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) (e possivelmente de outros alvos) em toda medula espinhal e no tálamo (e não somente no lado ipsilateral à lesão), levando ao aumento dos níveis de prostaglandina E₂ no líquido, o que causa efeitos nociceptivos sistêmicos em

animais. Ainda é possível observar aumento nos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF α) na pata contralateral (WOOLF et al., 1997).

O TNF α é um fator imunomodulatório produzido por várias células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos ativados e macrófagos) e também por células teciduais (células endoteliais, do músculo liso, fibroblastos e queratinócitos) (DI GIOVANE et al., 1991; VILCEK e LEE, 1991; VASSALLI, 1992; ZHANG et al., 1995). Entre as suas múltiplas ações estão a citólise e mitogênese, recrutamento de polimorfonucleares e linfócitos, além de iniciar a cascata de outras citocinas como IL-6 e IL-1 β (ISSEKUTZ et al., 1994; LUKACS et al., 1995; ZHANG et al., 1995). Os níveis de TNF α encontram-se aumentados em doenças como o choque endotóxico (HASKO et al., 1995), gota (DI GIOVANE et al., 1991), artrite reumatóide (ISSEKUTZ et al., 1994), hipersensibilidade de contato (PIGUET et al., 1991), inflamação das vias aéreas (LUKACS et al., 1995) e nas doenças imunocomplexas (SEKUT et al., 1994). A sua atividade hiperalgésica foi observada pela sua administração local (CUNHA et al., 1992) ou sistêmica (WATKINS et al., 1995) ou ainda pela ação anti-hiperalgésica causada por anticorpos anti-TNF α em inflamações induzidas por bradicinina, LPS e carragenina (CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993).

Estudos recentes mostram o envolvimento de citocinas, como IL-1 e TNF- α também na patofisiologia da dor neuropática (SOMMER et al., 1999; SORKIN e DOOM, 2000). No tecido vizinho de onde ocorreu a lesão neuronal, ocorre a resposta inflamatória levando a acidose e infiltração de várias células do sistema imune. As células envolvidas com o processo inflamatório podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais. Pesquisas recentes demonstram que a dor neuropática ocorre, pelo menos em parte, devido a reação inflamatória local (TRACEY e WALKER, 1995; BENNETT, 1999). Neste caso, a lesão nervosa pode envolver o recrutamento de leucócitos (polimorfonucleares na fase aguda e macrófagos e células T na fase crônica), bem como liberação de mediadores inflamatórios (cininas, complemento, citocinas) (TRACEY e WALKER, 1995). Além do sistema neuronal, a

lesão nervosa pode envolver componentes das respostas inflamatórias, principalmente os associados à remoção dos axônios ou das células de Schwann destruídas. De fato, a hiperalgesia causada pela lesão de nervos periféricos pode ser resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias por células imunes ativadas ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6 e IL-8) (NATHAN, 1987).

Várias características são comuns em ambos os modelos de nocicepção persistente, porém os sintomas clínicos e a eficácia dos tratamentos diferem. Assim, alguns analgésicos são efetivos apenas contra um tipo específico de dor persistente (FIELDS, 1988; 1989). A morfina, por exemplo, é eficiente no tratamento das dores inflamatórias, porém é menos efetiva no tratamento da dor neuropática (ATTAL et al., 1998; FIELD et al., 1997; 1999). Ao contrário, o tratamento com a droga anticonvulsivante gabapentina tem mostrado bons resultados na dor neuropática e apresenta baixa atividade na dor inflamatória (BELKNAP et al., 1998; 1989; 1990; MOGIL e ADHIKARI, 1999). Estas diferenças podem estar fundamentadas nas mudanças neuroquímicas existentes. Estudos imunocitoquímicos realizados por HONORE e colaboradores (2000) descrevem diferenças neuroquímicas na medula espinhal, quando se compara a dor inflamatória e a dor neuropática. Assim, os níveis de vários mediadores importantes envolvidos na gênese da dor têm se mostrado alterados em algumas neuropatias. Os níveis de substância P e CGRP estão aumentados durante a inflamação, mas drasticamente diminuídos na neuropatia, os níveis de neuropeptídeo Y permanecem inalterados na dor inflamatória, porém estão aumentados na neuropatia. Por outro lado, estes mesmos pesquisadores mostraram que a imunoreatividade da PKC γ é semelhante nesses dois tipos de dor persistente. Desta forma, tanto a dor neuropática quanto a inflamatória induz um aumento no nível desta proteína quinase (HONORE et al., 2000).

A ação anti-alodínica do ácido tormêntico nesses dois modelos de nocicepção persistente pode envolver mecanismos comuns, possivelmente nos sinais de transdução intracelulares. Como já comentado, a família das PKCs, especialmente as isoformas PKC ϵ , PKC γ e PKC β il parece ser responsável pela modulação das respostas dolorosas em diferentes

níveis do eixo neuronal. Tem sido descrito que a PKC ϵ , por exemplo, exerce papel importante na dor inflamatória crônica (ALEY et al., 2000). Além disso, a PKC ϵ pode modular a hiperalgesia mecânica induzida pelo NGF (KHASAR et al., 1999) e sensibilizar os nociceptores em resposta ao calor (CESARE et al., 1999). Por outro lado, um importante papel tem sido atribuído para a PKC γ no desenvolvimento e na manutenção da dor persistente associada tanto com a inflamação prolongada quanto com o dano neuronal (MAO et al., 1995; MALMBERG et al., 1997b; MARTIN et al., 1999;). Pesquisas recentes realizadas por IGWE e CHRONWALL (2001) mostram o envolvimento de PKC β II na iniciação e na manutenção da hiperalgesia induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). Em conjunto, essas evidências sugerem que o efeito antinociceptivo do ácido tormêntico observado no presente estudo pode estar associado à sua interação com algumas das subfamílias das PKCs que reconhecidamente estão envolvidas na transmissão da nocicepção. Contudo, estudos adicionais são necessários para a confirmação desta hipótese.

Como discutido anteriormente, vários são os alvos farmacológicos para a descoberta de novas drogas analgésicas. Porém, muitos destes alvos também são importantes para funções fisiológicas, contribuindo para o aparecimento de efeitos adversos. Por exemplo, injeções periféricas de antagonistas de receptores NMDA atenuam dores inflamatórias e associadas a neuropatia (QIAN et al, 1996; ZHOU et al., 1996; LAWAND et al., 1997; DAVIDSON et al., 1997), mas causam inúmeros efeitos adversos tais como ataxia, ações alucinógenas, diminuição na capacidade cognitiva e neurotoxicidade no córtex retroespinal. Esses efeitos colaterais impedem o uso destas drogas na clínica médica (TZSCHENTKE e SCHMIDT, 1998; WIESENFELD-HALLIN, 1998). Somando-se a isso, estudos realizados por TRUJILLO e AKIL (1991) mostraram que o uso combinado de MK-801 e morfina aumenta a mortalidade em animais de laboratório em comparação aos tratados apenas com morfina. Neste sentido, nosso trabalho também apresenta resultados claros de que a antinocicepção causada pelo ácido

tormêntico não parece ser secundária a possíveis efeitos centrais depressores e/ou não específicos deste composto. Tal observação está baseada no fato de que nas mesmas doses em que o ácido tormêntico apresentou pronunciado efeito antinociceptivo, não foi observado efeito incapacitante ou alteração da coordenação motora, quando avaliado no teste de *rota rod* (DUHAM e MIYA, 1957; ROSLAND et al., 1990). Por outro lado, doses relativamente baixas de gabapentina (100 mg/kg, v.o.) causaram diminuição da atividade motora e exploratória em camundongos, quando avaliados no campo aberto. Além disto, o ácido tormêntico, nas mesmas doses que produziu antinocicepção, não interferiu com a temperatura corporal, o que poderia influenciar nos resultados dos testes comportamentais (MOGIL et al., 1998). Finalmente, o ácido tormêntico não causou irritação na mucosa gástrica dos animais.

Contudo, Ivorra e colaboradores (1988) mostraram o ácido tormêntico, na dose de 600 mg/kg, administrado pela via intraperitoneal (dose 3 vezes superior à maior dose que causou atividade antinociceptiva em nosso estudo) causou leve sedação e diminuição da atividade motora. Estudos toxicológicos deverão ser realizados para uma avaliação mais precisa dos possíveis efeitos adversos causados por altas doses de ácido tormêntico. Porém o ácido tormêntico parece possuir uma janela terapêutica ampla.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que o triterpeno pentacíclico denominado ácido tormêntico, administrado por via sistêmica e local apresentou atividade antinociceptiva importante quando avaliado em diversos modelos de nocicepção em camundongos. Entre seus principais efeitos destacam-se sua marcada e prolongada ação antinociceptiva quando administrado oralmente em dois modelos de dor persistente; a neuropatia causada pela constrição parcial do nervo ciático e a dor inflamatória causada pela administração de CFA em camundongos. Além disso, nas diversas doses e esquemas de tratamentos empregados no presente estudo, não foram observadas reações adversas para o ácido

tormêntico, fenômeno comum observado com a maioria das drogas empregadas na clínica para o tratamento da dor. Assim, o ácido tormêntico ou seus derivados apresentam potencial interesse para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de dores crônicas, em especial aquelas observadas nas neuropatias e nos processos inflamatórios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAENSEN, H.; GYBEL, J.; HANDWERKER, H.O.; VAN HESS, J. Response properties of thin myelinated (A-delta) fiber in human skin nerves. **J. Neurophysiol.**, v. 49, p. 111-122, 1983.
- ALEY, K.O.; MESSING, R.O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the ϵ of protein kinase C. **Neuroscience**, v. 20, p. 4680-4685, 2000.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v.353, p.1865-1869, 1999.
- ATTAL, N.; BRASSEUR, L.; PARKER, F.; CHAUVIN, M.; BOUHASSIRA, D. Effects of gabapentin on the different components of peripheral and central neuropathic pain syndromes: a pilot study. **Eur. Neurol.**, v. 40(4), p.91-200, 1998.
- BEAUBIEN, G.; ROSINSKI-CHUPIN, I.; MATTEI, M.G.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M.; SAIDAH, N.G. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochemistry**, 30: 1628-1635, 1991.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain. Res.**, v. 924, p. :219-228, 2002.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; HESS, S.C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R.A. Study of the Antinociceptive Action of the Ethanolic Extract and the Triterpene 24-Hydroxytormentonic Acid Isolated from *Ocotea suaveolens* (Meissn) Hassier. **Planta Medica**, v. 65, p. 50 – 55, 1999.

- BELKNAP, J.K.; LAME, M.; DANIELSON, P.W. Inbred strain differences in morphine-induced analgesia with the hot plate assay: a reassessment. **Behav. Genet**, v. 20, p. 333-338, 1990.
- BELKNAP, J.K.; LAURSEN, S.E.; SAMPSON, K.E.; WILKIE, A. Where are the mu receptors that mediate opioid analgesia? An autoradiographic study in the HAR and LAR selection lines. **J. Addict. Dis.**, v. 10, p. 29-44, 1991.
- BELKNAP, J.K.; NOORDEWIER, B.; LAME, M. Genetic dissociation of multiple morphine effects among C57BL/6J, DBA/2J and C3H/HeJ inbred mouse strains. **Physiol. Behav.**, v.46, p. 69-74, 1989.
- BENET, L.Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L.B. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. *In* As bases farmacológicas da terapêutica (eds Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R. W. e Goodman Gilman, A.), pp. 3-20, McGraw-Hill, New York, 1996.
- BENNETT, G.J. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.7737-7738, 1999.
- BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BESSION, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, v.67, p.67-186, 1987.
- BEVAN, S.; STOREY, N. Modulation of sodium channels in primary afferent neurons. **Novartis. Found. Symp.**, v. 241, p. 144-153, 2002.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, v.44, :p.1-44, 1992.
- BONICA, J.J. The management of pain. Philadelphia. Lea & Febiger, 1990.

- BOXALL, S.; BERTHELE, A.; THOMAS, R.; ZIGLGÄNSBERGER, T.W.; URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuro Report**, v. 9, p. 1201-1203, 1998.
- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytother. Res.**, v.14, p.1-18, 2000a.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p.1-5, 2000b.
- CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin. Emerging Drugs**, v. 6, p.261-279, 2001.
- CAO, Y.Q.; MANTYH, P.W.; CARLSON, E.J.; GILLESPIE, A.M.; EPSTEIN, C.J.; BASBAUM, A.I. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. **Nature**, v. 392, p. 390-394, 1998.
- CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci. Lett.**, 197:25-28, 1995.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, v.353, p. 2051-2058, 1999.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.
- CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p. 306-313, 2000.
- CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; MCNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC- ϵ in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, v. 23, p. 617-624, 1999.

- CHUANG, H.H.; PRESCOTT, E.D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S.E.; BASBAUM, A.I.; CHAO, M.V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, p. 957-962, 2001.
- COHEN, R.H.; PERL, E.R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **J. Neurophysiol.**, v.64, p.457-464, 1990.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.107(3), p.660-664, 1992.
- DAMAJ, M.I.; GLASSCO, M.D.; MARTIN, B.R. Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 291, p. 390-398, 1999.
- DAVIDSON, E.M.; COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport**, v. 8, p. 941-946, 1997.
- DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S.A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A.J.; PUGH, P.L.; ROGERS, D.C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183-187, 2000.
- DE SMET, P.A.G.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

- DI GIOVINE, F.S.; MALAWISTA, S. E.; THORNTON, E.; DUFF, G.W. Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution. **J. Clin. Invest.**, v.87(4), p.1375-1381, 1991.
- DICKENSON, A.H. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, v. 27, p. 223-227, 1995.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 157-172, 1997.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.**, v.16, p.99-104, 1993.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Amer. Pharm. Assoc.**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- ERGIL, K.V. The use of herbs in traditional chinese medicine. **Pharmaceutical News**, v. 3, p. 29-31, 1996.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol**, v. 201, p. 121-122, 1991.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110(3), p.1227-1231, 1993.
- FIELD, M.J.; MCCLEARY, S.; HUGHES, J.; SINGH, L. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical

- allodynia induced by streptozocin in the rat. **Pain**, v.80(1-2), p.391-398, 1999.
- FIELD, M.J.; OLES, R.J.; LEWIS, A.S.; MCCLEARY, S.; HUGHES, J.; SINGH, L. Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. **Br. J. Pharmacol**, v.121, n. 8, p.1513-1522, 1997.
- FIELDS, H.L. Pain modulation: opiates and chronic pain. **NIDA Res. Monogr.**, v. 95, p.92-101, 1989.
- FIELDS, H.L. Can opiates relieve neuropathic pain? **Pain**, v. 35(3), p.365-367, 1988.
- FUJIMAKI, H.; KAWAGOE, A.; BISSONNETTE, E.; BEFUS, D. Mast cell response to formadehyde. Modulation of mediator release. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 98, p. 324-331, 1992.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, p.129-141, 1999.
- GAMSE, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 320, p. 205-216, 1982.
- GAMSE, R.; LEEMAN, S.E.; HOLZER, P.; LEMBECK, F. Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P, and neurotensin in the nervous system of the rat. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 317, p. 140-148, 1981.
- GAMSE, R.; MOLNAR, A.; LEMBECK, F. Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. **Life Sci.**, v. 25, p. 629-636, 1979.
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 81, p. 8-11, 1998.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

- HASKO, G.; ELENKOV, I.J.; KVETAN, V.; VIZI, E.S. Differential effect of selective block of alpha 2-adrenoreceptors on plasma levels of tumour necrosis factor-alpha, Interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice. **J. Endocrinol.**, v. 144(3), p. 457-462, 1995.
- HASMEDA, M.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; POLYA, G.M. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Medica**, v. 65, p. 14-18, 1999.
- HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N.J.W. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 90, p. 164, 1987.
- HESS, S.C.; MONACHE, F.D. Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. **J. Braz. Chem Soc.** v. 10, p. 104-106, 1999.
- HIRAI, N.; SUGIE, M.; WADA, M.; LAHLOU, E.H.; KAMO, T.; YOSHIDA, R.; TSUDA, M.; OHIGASHI, H. Triterpene phytoalexins from strawberry fruit. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1707-1712, 2000.
- HOFFMAN, F.A.; LEADERS, F.E.Jr. Botanical (herbal) medicine in health care: a review from a regulatory perspective. **Pharmaceutical News**, v. 3, p. 23-25, 1996.
- HOLLOSY, F.; MESZAROS, G.; BOKONYI, G.; IDEI, M.; SEPRODI, A.; SZENDE, B.; KERI, G. Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 4563-4570, 2000.
- HONORE, P.; ROGERS, S.D.; SCHWEI, M.J.; SALAK-JOHNSON, J.L.; LUGER, N.M.; SABINO, M.C.; CLOHISY, D.R.; MANTYH, P.W. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. **Neuroscience**, v.98(3), p.585-98, 2000.
- HOUGHTON, P.J.; LIAN, L.M. Triterpenoids from *desfontainia-spinosa*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1939-1944, 1986.

- HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, v. 78, p. 731-747, 1997.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.
- HUNTER, J.C.; GOGAS, K.R.; HEDLEY, L.R.; JACOBSON, L.O.; KASSOTAKIS, L.; THOMPSON, J.; FONTANA, D.J. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 324(2-3), p. 153-160, 1997.
- HWANG, S.W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S-Y; KANG, C-Y; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K.H.; SUH, Y-G; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 6155-6160, 2000.
- HYLDEN, J.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 67, p. 313-316, 1980.
- IADAROLA, M.J.; CAUDLE, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, v.278, p.239-240, 1997.
- IGWE, Q.J.; CHRONWALL, B.M. Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C β 11 isozyme in the rat spinal. **Neuroscience**, v. 104 (3), p. 875-890, 2001.
- ISOBE, T.; NODA, Y.; OHSAKI, A.; SAKANAKA, S.; KIM, M.; TANIGUCHI, M. Studies on the constituents of *Leucoseptrum stellipillum*. **Yakugaku Zasshi**, v. 109, p. 175-178, 1989.
- ISSEKUTZ, A.C.; MEAGER, A.; OTTERNESS, I.; ISSEKUTZ, T.B. The role of tumour necrosis factor-alpha and IL-1 in polymorphonuclear leucocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.97(1), p.26-32, 1994.

- IVORRA, M.D.; PAYA, M.; VILLAR, A. Hypoglycemic and insulin release effects of tormentic acid: a new hypoglycemic natural products. **Planta Medica**, v. 54, p. 282-286, 1988.
- JACKSON, D.L.; GRAFF, C.B.; RICHARDSON, J.D.; HARGREAVES, K.M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 284, p. 321-325, 1995.
- JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J.M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, E.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J. Neurocytol.**, v. 10, p. 963-980, 1981.
- JI, R.R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, p. 1-10, 2001.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; MCMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; MCCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, J.D.; MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C ϵ mutant mice. **Neuron**, v. 14, p. 253-260, 1999.
- KINGERY, W.S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. **Pain**, v. 73, 123-139, 1997.
- KOLTZENBURG, M. Painful neuropathies. **Curr Opin Neurol.**, v. 11(5), p. 515-521, 1998.
- LAI, J.; GOLD, M.S.; KIM, C.S.; BIANA, D.; OSSIPOV, M.H.; HUNTER, J.C.; PORRECA, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. **Pain**, v. 95, p. 143-152, 2002.

- LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods**, v. 16, p. 355-357, 1986.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 324, p. 169-177, 1997.
- LEE, K.H.; LIN, Y.M.; WU, T.S.; ZHANG, D.C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I.H.; CHANG, J.J.; WU, R.Y.; YANG, T.H. Antitumor agents .88. the cyto-toxic principles of prunella-vulgaris, psychotria-serpens, and hyptis-capitata - ursolic acid and related derivatives. **Planta Med.**, v. 4, p. 308-311, 1988.
- LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiol. Scand.**, v. 133, p. 435-454, 1988.
- LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, v.13, p.2273-2286, 1993.
- LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain, 3 rd Ed, Edin-burgh, Churchill Livingtone, pp. 45-56, 1994.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, p. 57-68, 1995.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.
- LOPSHIRE, J. C.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. **J. Neuroscience**, v. 15;18(16), p. 6081-6092, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FOSRR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 266-275, 1951.

- LUKACS, N.W.; STRIETER, R. M.; CHENSUE, S.W.; WIDMER, M.; KUNKEL, S.L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. **J. Immunol.** 1995 v.154(10), p. 5411-5417, 1995.
- LUTFY, K.; CAI, S.X.; WOODWARD, R.M.; WEBER, E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, v.70, p. 31-40, 1997.
- MACFARLENE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.**, v.75, p.1-19, 1997.
- MAHATO, S.B.; SEM, S. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. **Phytochemistry**, v. 44(7), p. 1185-1236, 1997.
- MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-222, 1998.
- MALMBERG, A.B.; BRANDON, E.P.; IDZERDA, R.L.; LIU, H.; MCKNIGHT, G.S.; BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 7462-7470, 1997a.
- MALMBERG, A.B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . **Science**, v. 278, p. 279-283, 1997b.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v.257, p.1276-1279, 1992.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; PHILIPS, L.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. **Neurosci. Lett.**, v. 198, p.75-78, 1995.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, J.P. Pharmacology of kinins; their relevance to tissue injury and inflammation. **Gen. Pharmacol.**, v.14, p..209-229, 1983.

- MARKENSON, J.A. Mechanisms of chronic pain. **Am. J. Med.**, v. 101, p. 6S-18S, 1996.
- MARQUES, M.I.; ADIS, J.; NUNES DA CUNHA, C.; SANTOS, G.B. Arthropod biodiversity in the canopy of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae), a forest dominant in the Brazilian Pantanal. **Stud. Neotrop. Fauna Environm.**, v. 36, p. 205-210, 2001.
- MARTIN, W.J.; LIU, H.; WANG, H.; MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C γ immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. **Neuroscience**, v. 88, p. 1267-1274, 1999.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Press: Seattle, 1994.
- MIKI, S.; YOSHINAGA, N.; IWAMOTO, T.; YASUDA, T.; SATO, S. Antinociceptive effect of the novel compound OT-7100 in a diabetic neuropathy model. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 430, p. 229-234, 2001.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v.57, p.161-164, 1999.
- MOBARAKEH, J.I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMA, S.; KUTSUWA, M.; KURAMASU, A.; LIN, Z.Y.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, Y.; YANAI, K. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 81-89, 2000.
- MOGIL, J.S.; ADHIKARI, S.M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **J. Neurosci.**, v. 19, p. RC25, 1999.
- MOGIL, J.S.; SHIN, Y.H.; MCCLESKEY, E.W.; KIM, S.C.; NAH, S.Y. Ginsenoside Rf, a trace component of ginseng root, produces antinociception in mice. **Brain Res.**, v. 792, p. 218-228, 1998.

- MOGIL, J.S.; WILSON, S.G.; BOM, K.; LEE, S.E.; CHUNG, K.; RABER, P.; PIEPER, J.O.; HAIN, H.S.; BELKNAP, J.K.; HUBERT, L.; ELMER, G.I.; CHUNG, J.M.; DEVOR, M. Heritability of nociception II. 'Types' of nociception revealed by genetic correlation analysis. **Pain**, v. 80, p. 83-93, 1999.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1955.
- MURRAY, S.R.; CHAO, J.; LIN, F.; CHAO, L. Kallikrein multigenes families and the regulation of their expression. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S7-S15, 1990.
- NAKANISHI, S.; MASU, M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 23, p. 319-348, 1994.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-326, 1987.
- OH, U.; HWANG, S.W.; KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 1659-1667, 1996.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v. 787, n. 1, p. 161-164, 1998.
- OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinli*. **Life Sci.**, v. 69, p. :2225-2236, 2001.

- PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, p. 937-944, 2001.
- PATEL, S.; NAEEM, S.; KESINGLAND, A.; FROESTL, W.; CAPOGNA, M.; URBAN, L.; FOX, A. The effects of GABA(B) agonists and gabapentin on mechanical hyperalgesia in models of neuropathic and inflammatory pain in the rat. **Pain**, v. 90, p. 217-226, 2001.
- PERKINS, M.N.; DRAY, A. Novel pharmacological strategies for analgesia. **Annals Rheumatic Diseases**, v. 55, p. 715-722, 1996
- PIGUET, P.F.; GRAU, G.E.; VASSALLI, P. Tumor necrosis factor and immunopathology. **Immunol. Res.** v.10(2), p.122-140,1991.
- PITCHER, G.M.; RITCHIE, J.; HENRY, I.J. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. **J. Neurosci. Methods**, v. 87, p.185-193, 1999.
- POTT, A.; POTT, V.J. In: Plantas do pantanal. EMBRAPA. Corumbá, Brasil, 1994.
- PREMKUMAR, L.S.; AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, v. 408, p. 985-990, 2000.
- PROCTER, M.J.; HOUGHTON, A.K.; FABER, E.S.L.; CHIZH, B.A.; ORNSTEIN, P.L.; LODGE, D.; HEADLEY, P.M. Actions of kainate and AMPA selective glutamate receptor ligands on nociceptive processing in the spinal cord. **Neuro Pharmacol.**, v.37, p. 1287-1297, 1998.
- PROUD, D.; KAPLAN, A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Ann. Rev. Immunol.**, v.6, p.49-83, 1988.
- QIAN, J.; BROWN, S.D.; CARLTON, S.M. Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy. **Brain. Res.**, v. 715, p. 51-62, 1996.

- RAIGORODSKY, G.; URCA, G. Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. **Brain Res.**, 422: 158-162, 1987.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 57-78, 1994.
- RECIO, M.D.C.; GINER, R.M.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Medica**, v. 61, p. 182-185, 1995.
- REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, v.32, 1-46, 1980.
- REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. In hot pursuit of the elusive heat transducers. **Neuron**, v. 26, p. 555-558, 2000.
- ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 66, p. 382-386, 1990.
- ROSNER, H.; RUBIN, L.; KESTENBAUM, A. Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. **Clin. J. Pain**, v. 12(1), p. 56-58, 1996.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.**, v. 49, p.123-133, 1998.
- SAFAYHI, H.; SAILER, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, p. 487-493, 1997.
- SAKATA, R.K.; GOZZANI, J.L. Fisiopatologia da dor. **Revista Brasileira de Medicina.**, v.51, p.3-5, 1994.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; MANOME, Y.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; OHBA, M. Antinociceptive effects in the formalin and capsaicin tests after intrathecal administration of substance P analogues in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 242, p. 47-52, 1993.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, v. 29, p. 271-278, 1996.

SAMAD, T.; MOORE, K.A.; SAPIRTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J.V. Interleukin-1 β -mediated induction of CO₂ in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-475, 2001.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, 31: 381-389, 1997a.

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, 1997b.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.; DE FREITAS, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 302-307, 1998.

SCHWARTZMAN, R.J.; GROTHUSEN, J.; KIEFER, T.R.; ROHR, P. Neuropathic central pain: epidemiology, etiology, and treatment options. **Arch. Neurol.**, v. 58, p. 1547-1550, 2001.

- SEKUT, L.; MENIUS, J.A. J.R.; BRACKEEN, M.F.; CONNOLLY, K.M. Evaluation of the significance of elevated levels of systemic and localized tumor necrosis factor in different animal models of inflammation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 124(6), p. 813-820, 1994.
- SELTZER, Z. The relevance of animal neuropathy models for chronic pain in humans. **Semin. Neurosci.**, v.7, p. 211-219, 1995.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1990.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.
- SHU, Y-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p.1053-1071, 1998.
- SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, v. 21, p. 227-236, 1946.
- SOMMER, C.; PETRAUSCH, S.; LINDENLAUB, T.; TOYKA, K.V. Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. **Neurosci. Lett.**, v. 270, p. 25-28, 1999.
- SORKIN, L.S.; DOOM, C.M. Epineurial application of TNF α elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 5, p. 96-100, 2000.
- SOUZA, D.O.; RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.**, v. 3, p. 39-45, 1991.
- SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Structure-activity studies of some oleanane triterpenoid glycosides and their related compounds from the leaves of *Tetrapanax papyrifera* on anti-inflammatory activities. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 5, p. 379-387, 1982.

- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p. 159-211, 1999.
- SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. *In: Tachykinin Antagonists* (eds Hakanson, R.; Sundler, F.), pp. 45-56, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- THEODOSIOU, M.; RUSH, R.A.; ZHOU, X.F.; HU, D.; WALKER, J.S.; TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. **Pain**, v.81(3), p.:245-55, 1999.
- TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 1-20, Springer, Berlin, 1997.
- TOMINAGA, M.; WADA, M.; MASU, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 6951-6956, 2001.
- TRACEY, D.J.; WALKER, J.S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm. Res.**, 44: 407-411, 1995.
- TRUJILLO, K.A.; AKIL, H. The NMDA receptor antagonist MK-801 increases morphine catalepsy and lethality. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 38, p.673-675, 1991.
- TZSCHENTKE, T.M.; SCHMIDT, W.J. Does the noncompetitive NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK801) really block behavioural sensitization associated with repeated drug administration? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, p. 447-451, 1998.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Ann. Ver. Immunol.**, v. 10, p. 411-452, 1992.
- VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 304-312, 1996.

- VILCEK, J.; LEE, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. **J. Biol. Chem.**, v.12, p. 7313-7316, 1991.
- VILLAR, A.; PAYÁ, M.; HORTIGÜELA, M.D.; CORTES, D. Tormentic acid, a new hypoglycemic agent from *Poterium ancistroides*. **Planta Medica**, v. 1, p. 43-45, 1986.
- WALKER, K.; FOX, A.J.; URBAN, L.A. Animal models for pain research. **Mol. Med. Today**, v. 5, n. 7, p. 319-321, 1999.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, v.63(3), p. 289-302, 1995.
- WIESENFELD-HALLIN, Z. Combined opioid-NMDA antagonist therapies. What advantages do they offer for the control of pain syndromes? **Drugs**, v. 55, p. 1-4, 1998.
- WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X.J. Neuropeptides in neuropathic and inflammatory pain with special emphasis on cholecystokinin and galanin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, p. 45-59, 2001.
- WOOD, J.N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 59, p.457-482, 1997.
- WOOLF, C.J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor α . **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p. 417-424, 1997.
- WOOLF, C.J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 7723-7730, 1999.
- WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v.353, p.1959-1965, 1999.

- WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288(5472), p. 1765-1769, 2000.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 80, p. 300-307, 1944.
- XU, H.X.; ZENG, F.Q.; WAN, M.; SIM, K.Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 643-645, 1996.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.T.L. Effects of colchicine applied to the peripheral nerve on the thermal hyperalgesia evoked with chronic nerve constriction. **Pain**, v.55, p. 227-233, 1993.
- YING, Q.L.; RINEHART, A.R.; SIMON, S.R.; CHERONIS, J.C. Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. **Biochem. J.**, v. 277, p. 521-526, 1991.
- ZAHN, P.K.; UMALI, E.; BRENNAN, T.J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. **Pain**, v. 74, p. 213-223, 1998.
- ZHANG, Y.; RAMOS, B.F.; JAKSCHIK, B.; BAGANOFF, M.P.; DEPPELER, C.L.; MEYER, D.M.; WIDOMSKI, D.L.; FRETLAND D.J.; BOLANOWSKI M.A. Interleukin 8 and mast cell-generated tumor necrosis factor-alpha in neutrophil recruitment. **Inflammation**, v.19(1), p.119-132, 1995.
- ZHOU, S.; BONASSERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, v. 7, p. 895-900, 1996.

SUMMARY

This study aimed to address if the pentacyclic triterpene tormentic acid isolated from the stem bark of the plant *Vochysia divergens* exerts antinociception in various models of chemical and thermal acute nociception in mice when given by oral (p.o.), intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.), intrathecal (i.t.) or by intracerebroventricular (i.c.v.) routes. We also evaluated by the use of neurochemical procedures, if tormentic acid can interact with glutamate receptor binding sites in mouse cortical brain membranes. Give orally, but not given i.t. or by i.c.v. routes, tormentic acid produced dose related inhibition of both phases of formalin-inducing licking. In addition, tormentic acid produced significant antinociception when injected by oral, i.p. or i.pl. routes against glutamate-induced licking and orally against capsaicin-induced licking. Furthermore, tormentic acid administered orally caused dose-related analgesia in the hot plate test. Another new series of experiments was designed to evaluate whether tormentic acid produces oral anti-allodynic properties in two models of chronic pain in mice: the persistent neuropathic pain caused by partial ligation of the sciatic nerve and the inflammatory persistent allodynia produced by intraplantar injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA). Oral administration of tormentic acid twice a day for several consecutive days produced pronounced time-dependent and inhibition of CFA-induced-allodynia in both ipsilateral and contralateral paws. Interestingly, tormentic acid did not inhibit paw oedema formation following CFA plantar Injection. Tormentic acid, like gabapentin, given twice a day for several consecutive days, inhibited markedly the neuropathic allodynia induced by partial ligation of sciatic nerve. The anti-allodynic action of tormentic acid was long lasting and not associated with motor activity impairment or body temperature reduction. Moreover, tormentic acid did not irritate gastrointestinal mucosa. The radioligand binding studies revealed that tormentic acid, failed to displace the [³H]-glutamate binding sites from mice cortex membranes. Together, the present results indicate that tormentic acid and/or its derivatives might be of potential interest in the

development of new clinically relevant drugs for the management of persistent inflammatory allodynia and neuropathic pain.