

DANIELA TAGLIARI LONGHI BALBINOT

**Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do
triterpeno 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-eno (TTHL) isolado de
*Combretum leprosum***

Florianópolis

2010

DANIELA TAGLIARI LONGHI BALBINOT

**Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do
triterpeno 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-eno (TTHL) isolado de
*Combretum leprosum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

Florianópolis

2010

*Dedico essa tese ao meu esposo Alvadi (Kiko) pelo
apoio, compreensão e companheirismo*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido força, coragem, ânimo e fé para superar as dificuldades que surgiram ao longo do desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus pais, Antonio e Solange, e irmãos, Luciano e Adriano por sempre me apoiarem e incentivarem a crescer como pessoa e profissional. Amo muito vocês.

Ao meu esposo. Kiko, você é uma pessoa muito especial que Deus colocou em meu caminho. Obrigada pelo incentivo, auxílio, carinho, amizade, amor, dedicação, compreensão e, principalmente paciência, dispendidos a mim ao longo da minha graduação, mestrado e doutorado. Te amo.

Ao meu anjinho, que agora, como um bom anjo, está tocando harpas no céu. Vó Amábile, obrigada pelos ensinamentos e pelas suas orações. Sempre te amarei.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela paciência, respeito, ensinamentos e confiança em meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Valdir Facundo (Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia-UNIR) pela realização do estudo químico e fornecimento do triterpeno isolado de *Combretum leprosum*;

Ao Prof. Juliano Ferreira (Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM), pela oportunidade de realizar os experimentos de ligação específica de glutamato, em seu laboratório.

Aos funcionários desta Universidade em especial o seu Carlinhos e dona Vilma, sempre prontos a nos auxiliar e também por tornarem os nossos dias mais alegres e descontraídos;

Aos colegas e amigos do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (UFSC): Maria Fernanda, Cris Baggio, Cris Setim, Vinícius, Morgana, Gaúcho, Wladimir, Bira, Vanessa, Daniel, Leidi, Ney, Deise, Marina, Débora, Chico, Fran, Tati, Denise, Serginho, Marcieli, Luana, Nayara, pela companhia, amizade, união e ótima convivência.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

“A distância entre o sonho e a realidade chama-se disciplina.”

Bernardo Rocha de Rezende (Bernadinho)

RESUMO

A procura por constituintes ativos de plantas apresenta como possibilidade a descoberta de novas substâncias que atuem em diversos processos patológicos acompanhados de dor. A *Combretum leprosum* Mart, conhecida como “cipoaba”, “mofumbo” ou “carne-de-vaca” é uma planta utilizada na medicina popular para o tratamento de hemorragias, cicatrização de feridas, como sedativa, antitussígena e antiofídica. Desta forma, o presente estudo avaliou a atividade antinociceptiva do triterpeno pentacíclico, 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-eno (TTHL) obtido das flores de *C. leprosum*, bem como alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo deste composto. O TTHL administrado oralmente (v.o.) promoveu redução significativa da nocicepção induzida pelo ácido acético e formalina (tanto na primeira quanto segunda fase da formalina) em camundongos. O TTHL administrado v.o. também reduziu a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato, sendo que o seu efeito máximo foi observado 1 h após a administração na dose de 30 mg/kg e permaneceu até 6 h. O TTHL também foi capaz de reduzir de forma dependente da dose a nocicepção causada pelo glutamato, tanto administrado centralmente (via intratecal) quanto periféricamente (via intradérmica, co-administrado com o glutamato). O efeito antinociceptivo do TTHL, administrado por via oral, envolve o sistema opioide e serotoninérgico, uma vez que seu efeito antinociceptivo foi revertido pela naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides), CTOP (antagonista seletivo de receptores μ -opioide), nor-binaltorfimina (antagonista seletivo de receptores κ -opioide), naltrindol (antagonista seletivo de receptores δ -opioide), PCPA (p-clorofenilalanina, inibidor da síntese de serotonina), WAY100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) e cetanserina (antagonista seletivo de receptores 5-HT₂). Além disso, o efeito antinociceptivo do TTHL envolve também a ativação da proteína Gi e abertura de alguns canais de K⁺, como os dependentes de ATP, os dependentes de voltagem e os de alta condutância operados por Ca²⁺, tendo em vista que seu efeito foi bloqueado pela toxina pertussis, glibenclamida, tetraetilamônio e caribdotoxina, respectivamente. O TTHL, administrado intratecalmente em associação com os agentes álgicos, reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato, NMDA e trans-ACPD sem causar alteração da atividade locomotora dos animais, mas não inibiu a resposta causada pelo AMPA e cainato. Além disso, o TTHL foi capaz de deslocar o glutamato de seus receptores e transportadores, verificado no ensaio de ligação específica com [³H]-L-glutamato, tanto na ausência quanto na presença de Na⁺ em membrana de encéfalo de camundongos. Estes resultados indicam que o TTHL interage tanto com receptores de glutamato como transportadores de glutamato. Em adição, o TTHL administrado v.o. ou i.t. inibiu significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.t. de citocinas pró-inflamatórias tais como: TNF- α e IL-1 β . Adicionalmente, a administração de TTHL por via oral reverteu significativamente a alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático, um modelo de dor crônica. Em síntese, o presente trabalho demonstrou que o TTHL exerce significativo efeito antinociceptivo tanto em modelos de dor aguda quanto crônica, sendo que seu mecanismo de ação envolve, pelo menos em parte, a inibição do sistema glutamatérgico. Assim, o TTHL ou seus derivados podem se tornar moléculas úteis para o desenvolvimento de fármacos de interesse terapêutico no controle da dor.

Palavras-chave: TTHL, antinocicepção, glutamato, opióides, serotonina

ABSTRACT

Combretum leprosum Mart, popularly known as mofumbo, cipoaba or carne-de-vaca, has been used in folk medicine to heal wounds, treat hemorrhages or as sedative. The present study investigated the antinociceptive effect of the pentacyclic triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene (TTHL) in mice as well as some mechanisms underlying the antinociception produced by this compound as well the possible involvement of the glutamatergic system in this effect. Oral administration (p.o.) of TTHL significantly inhibited the nociception induced by acetic acid and also inhibited the nociception induced by formalin. TTHL (p.o.) significantly inhibited glutamate-induced nociception. This action started 1h after p.o. administration and remained significant up to 6 h. In addition, TTHL given by intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.) or intrathecal (i.t.) routes, produced dose-dependent inhibition of glutamate-induced nociception. The antinociceptive effect of systemically administered TTHL seems to be dependent of the opioidergic and serotonergic systems, since this effect was reversed by the pre-treatment of mice with naloxone (non-selective opioid receptor antagonist), CTOP (selective μ -opioid receptor antagonist), nor-binaltorfimine (selective κ -opioid receptor antagonist), naltrindol (selective δ -opioid receptor antagonist), p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, inhibitor of serotonin synthesis), WAY100635 (selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) and ketanserin (selective 5-HT_{2A} receptor antagonist). Furthermore, TTHL antinociceptive effect was prevented by intrathecal (i.t.) pre-treatment with pertussis toxin (inactivator of Gi protein), charybdotoxin (blocker of large-conductance calcium-gated K⁺ channels), tetraethylammonium (blocker of voltage-gated K⁺ channels) and glibenclamide (blocker of ATP-gated K⁺ channels). I.t. injection of TTHL also caused significant and dose-dependent reduction of nociceptive response induced by i.t. injection of glutamate. Moreover, TTHL co-injected by i.t. route with agonist caused marked reduction of nociceptive responses induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA), (\pm)-1-aminocyclopentane-trans-1,3 dicarboxylic acid (trans-ACPD). Binding experiments indicated that TTHL interact with glutamate receptors and also with glutamate transporters. In addition, TTHL, either administered by p.o or i.t. routes, reduced the nociceptive response induced by i.t. injection of TNF- α e IL-1 β . Oral administration of TTHL significantly reversed mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve injury neuropathy. Together, these results showed that TTHL antinociceptive effect is dependent on opioid and serotonergic systems, Gi protein activation and the opening of specific K⁺ channels. Furthermore, this study provides experimental evidence for the involvement of the glutamatergic system (NMDA and metabotropic glutamate receptors) in the antinociceptive action caused by TTHL in mice. Thus, TTHL could represent an important compound for the treatment of pain.

Keywords: triterpene, glutamate, antinociception, opioid, serotonin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do corno dorsal da medula espinhal. A projeção dos axônios das fibras aferentes primárias ($A\beta$, C e $A\delta$) são altamente organizadas em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal	16
Figura 2 – Via ascendente da nocicepção. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e $A\delta$) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula.....	17
Figura 3 – Via descendente da nocicepção. Principais áreas envolvidas no controle descende da dor. FDL: funículo dorso-lateral; FVL: funículo ventro-lateral; RVM: bulbo (medulla) rostro-ventral; LC: locus coeruleus; PAG: substância cinzenta periaquedutal.	18
Figura 4 – Partes aéreas de <i>Combretum leprosum</i> . Folhas, flores e frutos.....	24
Figura 5 – Estrutura do $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno. PM: 458 g/mol.....	30
Figura 6 – Efeito antinociceptivo do TTHL administrado pela via oral em relação à nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos..	43
Figura 7 – Efeito do TTHL administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela injeção intradérmica de formalina 2,5% em camundongos.	44
Figura 8 – Efeito do TTHL administrado i.p. (1-30 mg/kg, painel A), i.pl. (3-30 μ g/kg, painel B) ou i.t. (10-300 μ g/sítio) em relação à nocicepção induzida pela injeção de glutamato i.pl. (C; 10 μ mol/pata, preparado em salina) em camundongos.....	46
Figura 9 – Efeito do TTHL administrado via oral em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina e pH ajustado para 7,0 com NaOH) em camundongos. (A) Curva dose-resposta (TTHL 3-100mg/kg, v.o). (B) Decurso temporal do efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.).....	47
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p., A), CTOP (1 mg/kg, s.c., B), nor-binaltorfimina (1 mg/kg, i.p., C) ou naltrindol (3 mg/kg, s.c., D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.	48
Figura 11 – Efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos, painel A), WAY 100635 (0,5 mg/kg, s.c., painel B), cetanserina (0,3 mg/kg, i.p., painel C) e ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p., painel D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.), morfina (2,5 mg/kg, s.c., A), buspirona (5 mg/kg, i.p., B), DOI (1 mg/kg, i.p., C) e agmatina (30 mg/kg, i.p., D) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.	49
Figura 12 – Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e do L-NAME (20 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.	50
Figura 13 – Efeito do pré-tratamento com toxina pertussis (0,5 μ g/sítio, i.t., 7 dias antes) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.	51
Figura 14 – Efeito do pré-tratamento com tetraetilamônio (TEA; 1 μ g/sítio, painel A), apamina (50 ng/sítio, painel B), caribdotoxina (250 pg/sítio, painel C) e glibenclamida (80 μ g/sítio, painel D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e da morfina (2,5	

mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos.....	52
Figura 15 – Efeito da administração i.t. de TTHL (6,5-218nmol/sítio, co-administrado) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (C, 175nmol/sítio, i.t).....	53
Figura 16 – Efeito da administração i.t. de TTHL (65,5 nmol/sítio, co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA (450 pmol/sítio), trans-ACPD (10 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), cainato (110 pmol/sítio) e SP (100 pmol/sítio) em camundongos.....	54
Figura 17 – Efeito da administração i.t. de (RS)-MCPG (100 nmol/sítio) ou MK-801 (3 nmol/sítio) (co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de glutamato (C; 175 nmol/sítio) em camundongos..	55
Figura 18 – Efeito da administração i.t. de (RS)-MCPG (100 nmol/sítio) ou MK-801 (3 nmol/sítio) (co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t de NMDA (450 pmol/sítio, painel A) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio, painel B) em camundongos..	56
Figura 19 – Efeito de doses subativas de MK-801 (1 nmol/sítio), (RS)-MCPG (30 nmol/sítio), TTHL (6,5 nmol/sítio), MK-801 (1 nmol/sítio) com TTHL (6,5 nmol/sítio), (RS)-MCPG (30 nmol/sítio) com TTHL (6,5 nmol/sítio) ou MK-801 (1 nmol/sítio) com (RS)-MCPG (30 nmol/sítio) (co-administração i.t.) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t de NMDA (450 pmol/sítio, painel A) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio, painel B) em camundongos.....	57
Figura 20 – Efeito do TTHL sobre a união específica de [³ H]-L-glutamato (na ausência de Na ⁺ , painel A; na presença de Na ⁺ , painel B) em membranas de encéfalo de camundongos..	58
Figura 21 – Efeito do TTHL administrado i.t. (65,5 nmol/sítio, co-administrado com as citocinas, painel A) ou administrado v.o. (30 mg/kg, painel B) na nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- α ou IL-1 β (0,1 pg/sítio, 1 pg/sítio, respectivamente) em camundongos.....	60
Figura 22 – Efeito do tratamento agudo (painel A) e crônico (painel B) do TTHL (30 mg/kg, v.o) no modelo de dor neuropática induzido pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.	61
Figura 23 – Prováveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do TTHL.....	76
Figura 24 – Efeito do TTHL (0,1-1 mM) na atividade da isoforma A da enzima MAO.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AC = adenilato ciclase
AMPA = Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP = trifosfato de adenosina
CFA = adjuvante completo de Freund
CGRP = Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CTOP = D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂
DAG = diacilglicerol
DHK = dihidrocainato
DHPG = (S)-3,5-Dihidroxifenilglicina
DOI = 2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina
EAAC = carreador de aminoácido excitatório
EAAT = transportador de aminoácido excitatório
FDL = funículo dorso lateral
FVL = funículo ventro lateral
GABA = ácido gama- aminobutírico
GIRK = canais de potássio com retificação em influxo regulados por proteína G
GLAST-1 = transportador de glutamato/aspartato
GLT-1 = transportador de glutamato 1
GRD = gânglio da raiz dorsal
5-HT = serotonina
i.p. = intraperitoneal
i.pl. = intraplantar/intradérmica
i.t. = intratecal
i.v. = intravenosa
IASP = Associação Internacional para o Estudo da Dor
IB4 = isolectina B4
iGluR = receptor ionotrópico de glutamato
IL-1 β = interleucina 1 β
IP3 = 1,4,5 fosfato de inositol
L-NAME = N ω -nitro-L-arginina metil éster
LC = locus coeruleus
MAO = monoamina oxidase
(RS)-MCPG = (RS)- α -metil-4-carboxifenilglicina
mGluR = receptor metabotrópico de glutamato
MK-801 = (5S,10R)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-5,10-imina
NaOH = hidróxido de sódio
NK1 = receptor para neurocinina 1
NMDA = N-metil-D-aspartato
NO = óxido nítrico
NOS = óxido nítrico sintase
PAG = substância cinzenta periaquedutal
PCPA = p- clorofenilalanina metil éster
PDC = L-trans-2,4-dicarboxilato de pirrolidina
PGE₂ = prostaglandina E₂
PIP₂ = fosfatidil-inositol bifosfato
PKC = protein quinase C
PTX = toxina pertussis
RVM = bulbo (medulla) rostro ventral

s.c. = subcutânea

SNC = sistema nervosa central

SP = substância P

TBOA = DL-threo- β -benziloxiaspartato

TEA = tetraetilamônio

TNF- α = fator de necrose tumoral α

TTHL = 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-eno

v.o. = via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOR	14
1.2	DOR CRÔNICA	18
1.3	PLANTAS MEDICINAIS	21
1.4	<i>COMBRETUM</i> – O GÊNERO	23
1.5	<i>COMBRETUM LEPROSUM</i> MART	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL BOTÂNICO: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO TTHL	29
4.2	ANIMAIS	30
4.3	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL	31
4.3.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	31
4.3.2	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%) em camundongos	31
4.3.3	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos	32
4.4	ANÁLISE DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO TTHL	33
4.4.1	Envolvimento do sistema opióide	33
4.4.2	Envolvimento do sistema serotoninérgico	34
4.4.3	Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico	34
4.4.4	Participação da proteína Gi	35
4.4.5	Envolvimento dos canais de K⁺	35
4.5	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TTHL	36
4.5.1	Nociceção induzida pela injeção intratecal (i.t) de aminoácidos excitatórios e substância P	36
4.5.2	Injeção i.t. de antagonistas de receptores NMDA e metabotrópicos	37
4.5.3	Injeção i.t. de doses subativas de TTHL, antagonistas de receptores NMDA e metabotrópico	37
4.5.4	Avaliação da atividade locomotora	38
4.5.5	Ensaio de união específica (“binding”) de [³H]-L-glutamato	38
4.5.5.1	Preparação das membranas	38
4.5.5.2	Ligação específica (“binding”) de [³ H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camundongos	39
4.6	PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	40
4.7	NEUROPATIA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO	40
4.7.1	Estimulação mecânica	41
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	43
5.1	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL	43
5.1.1	Efeito do TTHL sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos	43
5.1.2	Efeito do TTHL na nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos	44
5.1.3	Efeito do TTHL na nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos	44

5.2	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL.....	47
5.2.1	Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do TTHL	47
5.2.2	Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do TTHL	48
5.2.3	Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do TTHL.....	49
5.2.4	Envolvimento da proteína Gi no efeito antinociceptivo do TTHL.....	50
5.2.5	Envolvimento de canais de K ⁺ no efeito antinociceptivo do TTHL	51
5.3	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TTHL	52
5.3.1	Efeito do TTHL na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP	52
5.3.2	Efeito da injeção intratecal de MK-801 e (RS)-MCPG sobre a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato, NMDA ou trans-ACPD.....	54
5.3.3	Efeito da associação de doses subativas de TTHL, MK-801 e (RS)- MCPG sobre resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA ou trans-ACPD	56
5.3.4	Efeito do TTHL sobre a ligação específica (“binding”) de [³ H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camundongos	58
5.4	EFEITO DO TTHL SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DO CAMPO ABERTO).....	59
5.5	EFEITO DO TTHL NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	59
5.6	EFEITO DO TTHL NA DOR CRÔNICA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO ..	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE- PROTOCOLO PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA MONOAMINAOXIDASE-A (MAO A) IN VITRO	103
	ANEXOS	104
	ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY	105
	ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO NO EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

O organismo humano possui diversos sistemas e sinais responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor desempenha papel fisiológico importante, uma vez que ela é um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que ameace a integridade física do organismo (CHAPMAN, GAVRIN, 1999; JULIUS, BASBAUM, 2001). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão (JULIUS, BASBAUM, 2001; LOESER, TREEDE, 2008). Desta forma, além da experiência emocional, a dor está associada a um componente sensorial, denominado nocicepção, o qual depende da ativação de receptores específicos e vias neuroanatômicas que fazem a comunicação entre o sistema nervoso periférico e o sistema nervoso central (RUSSO, BROSE, 1998; JULIUS, BASBAUM, 2001; MENSE, 2009).

Originalmente, acreditava-se que a dor era proveniente apenas de uma experiência sensorial, como o prazer e o medo. No século XIX, este conceito foi substituído pela ideia de que a dor se deve à ativação de terminações nervosas especializadas. Em 1906, Charles Sherrington propôs a existência de receptores específicos/estruturas especializadas na periferia capazes de detectar estímulos nocivos, denominando-os de nociceptores (JULIUS, BASBAUM, 2001; MENSE, 2009).

Os nociceptores são estruturas específicas responsáveis pela detecção do estímulo nociceptivo em nível periférico. Eles estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes primários que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. Além disso, os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos nocivos que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários encontram-se nos gânglios trigeminiais e nos gânglios da raiz dorsal (GRD). Ambas estruturas são agrupamentos de corpos celulares de neurônios, normalmente encapsulados por células satélites de origem glial, responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia

para o núcleo trigeminal caudal ou para o corno dorsal da medula espinhal, respectivamente. Situados na coluna vertebral e dispostos lateralmente ao longo da medula espinhal, os GRDs contêm ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais (OLSSON, 1990; BESSON, 1999; WILLIS, COGGESHALL, 2004).

Desta forma, estímulos nociceptivos são detectados pelos nociceptores localizados nos terminais nervosos das fibras aferentes primárias periféricas e por meio destas transmitidos ao sistema nervoso central (SNC). Estas fibras são classificadas de acordo com a modalidade sensorial, os seus diâmetros e ainda com base na velocidade com que conduzem potenciais de ação. Dessa maneira, fibras $A\alpha$ e $A\beta$ representam proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo. Essas fibras são altamente mielinizadas, de maior diâmetro ($> 10 \mu\text{m}$), apresentam velocidade de condução rápida (30 a 100 m/s) e são particularmente abundantes na derme e epiderme. Apesar de não contribuírem para a dor em indivíduos normais, a estimulação dessas fibras pode aliviar a dor, o que ocorre quando elas são ativadas por fricção da pele pela mão após alguma lesão.

Por outro lado, algumas fibras com diâmetros menores possuem terminações nervosas periféricas livres, apresentam alto limiar de ativação e são responsáveis por detectar estímulos nocivos. Entre elas, as fibras $A\delta$ que são pouco mielinizadas, de médio diâmetro (2 a 6 μm) e velocidade de condução intermediária (12 a 30 m/s), enquanto que as fibras C são amielinizadas, de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm) e velocidade de condução lenta (0,5 a 2 m/s) (para revisão ver MILLAN, 1999; DJOUHRI, LAWSON, 2004; CAFFERTY, 2005; MENSE, 2009).

Estímulos nociceptivos de origem mecânica, térmica ou química podem ativar canais iônicos específicos presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes nociceptivas, gerando correntes despolarizantes que, dependendo da intensidade, iniciam os disparos dos potenciais de ação por ativação de canais de sódio sensíveis à voltagem. Sabe-se que uma vez ativadas, as fibras aferentes primárias liberam vários neurotransmissores (p. ex. glutamato e substância P), que por sua vez irão ativar neurônios secundários específicos, localizados em lâminas de Rexed na medula espinhal. A organização citoarquitetônica da medula espinhal permite distinguir anatomicamente onde cada tipo de fibra aferente primária termina, sendo que as lâminas de I a VI fazem parte do corno dorsal, as lâminas VII, VIII e IX constituem o corno ventral e a lâmina X representa as células organizadas ao redor do canal medular. Dessa

maneira, fibras $A\beta$, que conduzem informações não-nociceptivas, terminam principalmente nas lâminas III e IV, enquanto as fibras nociceptivas $A\delta$ e C projetam-se nas lâminas I e II, tornando-as importantes sítios para a regulação da informação nociceptiva (Figura 1; para revisão ver BESSON, CHAOUCH, 1987; WILLIS, COGGESHALL, 1991; MILLAN, 1999; TODD, KOURBER, 2005; RIBEIRO-DA-SILVA, DE KONICK, 2008; MENSE, 2009). Adicionalmente, as fibras C ainda podem ser divididas em dois subtipos considerando suas características neuroquímicas e funcionais. As fibras C peptidérgicas contêm neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP), projetam-se na lâmina I e na camada mais superficial da lâmina II. Por outro lado, as fibras C não-peptídicas são identificadas pela expressão de isolectina-B4 (IB4) e terminam predominantemente na camada mais profunda da lâmina II (NAGY, HUNT, 1982; SILVERMAN, KRUGER, 1990; MICHAEL et al., 1997; STUCKY, LEWIN, 1999; TODD, 2009; PRIESTELEY, 2009).

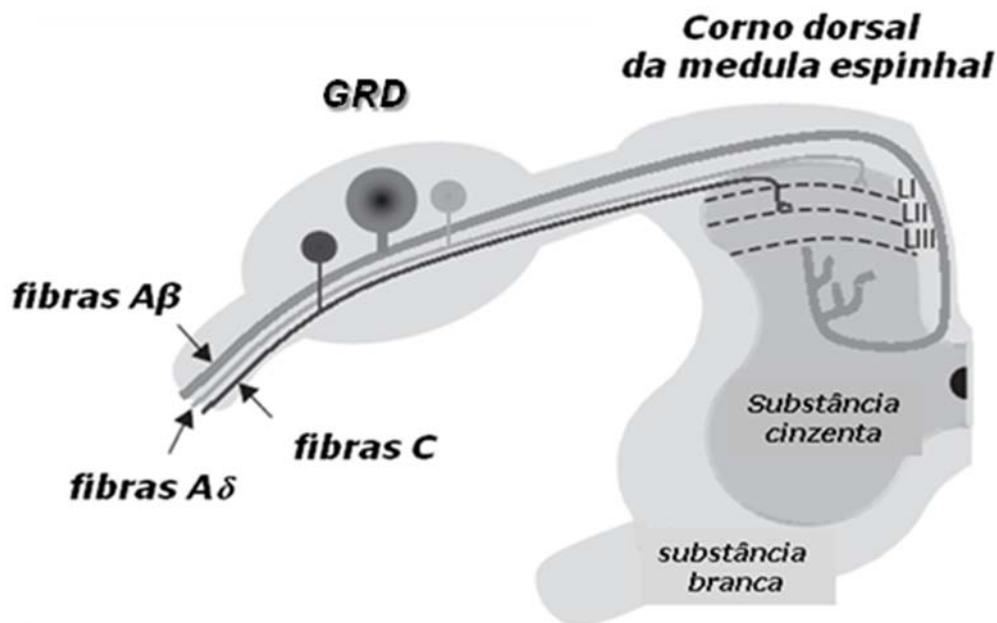


Figura 1 – Organização do corno dorsal da medula espinhal. A projeção dos axônios das fibras aferentes primárias ($A\beta$, C e $A\delta$) são altamente organizadas em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal. Fonte: adaptado de Cafferty, 2005.

As fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem na camada superficial da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, cruzam a medula espinhal até o lado contralateral e ascendem a múltiplas áreas supraespinhais por meio de tratos neuronais específicos (Figura 2), como por exemplo, o trato espinotalâmico. Assim, os neurônios de segunda ordem irão ativar no tálamo neurônios de terceira ordem levando a informação nociceptiva até as áreas sensoriais do córtex cerebral, onde aspectos

como qualidade, intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, levando à percepção da dor (VANDERAH, 2007).

É importante ressaltar que a transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal pode ser regulada negativamente por interneurônios inibitórios, que fazem sinapses na substância gelatinosa, onde liberam neurotransmissores e neuromoduladores tais como o ácido γ -aminobutírico (GABA), opióides endógenos e glicina, entre outros (para revisão ver MILLAN, 1999).

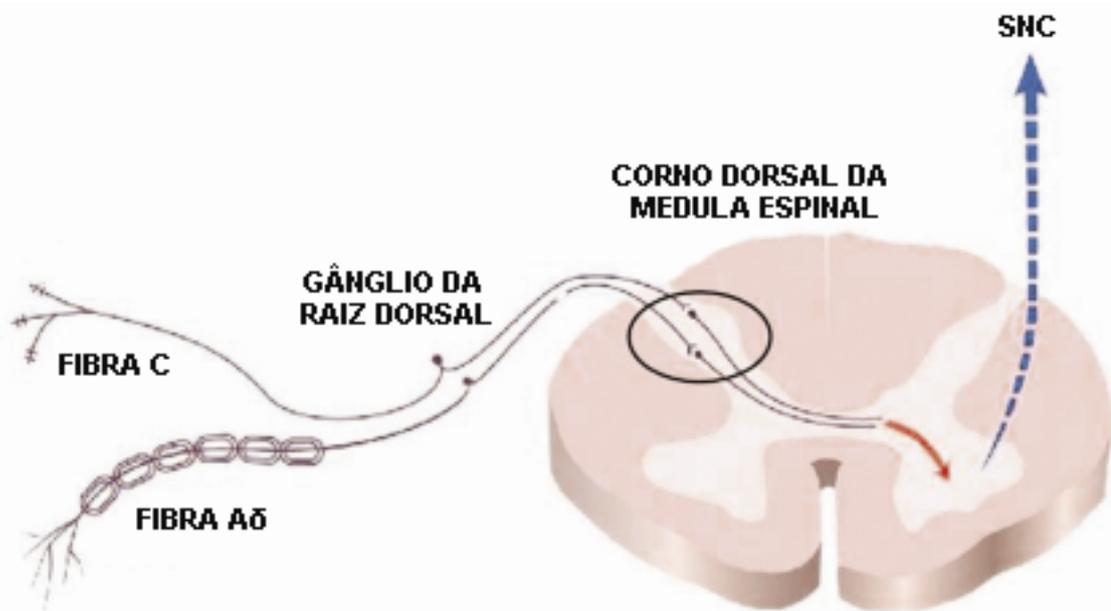


Figura 2 – Via ascendente da nocicepção. Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A δ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula. Fonte: adaptado de Freitas, 2009.

O organismo possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor por meio da via descendente (Figura 3) que envolve uma série de estruturas encefálicas, como o córtex cerebral, hipotálamo, amígdala, locus coeruleus (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), entre outros, bem como sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, adenosinérgico, além de canabinóides entre outras substâncias (para revisão ver MILLAN, 2002; YOSHIMURA, FURUE, 2006).

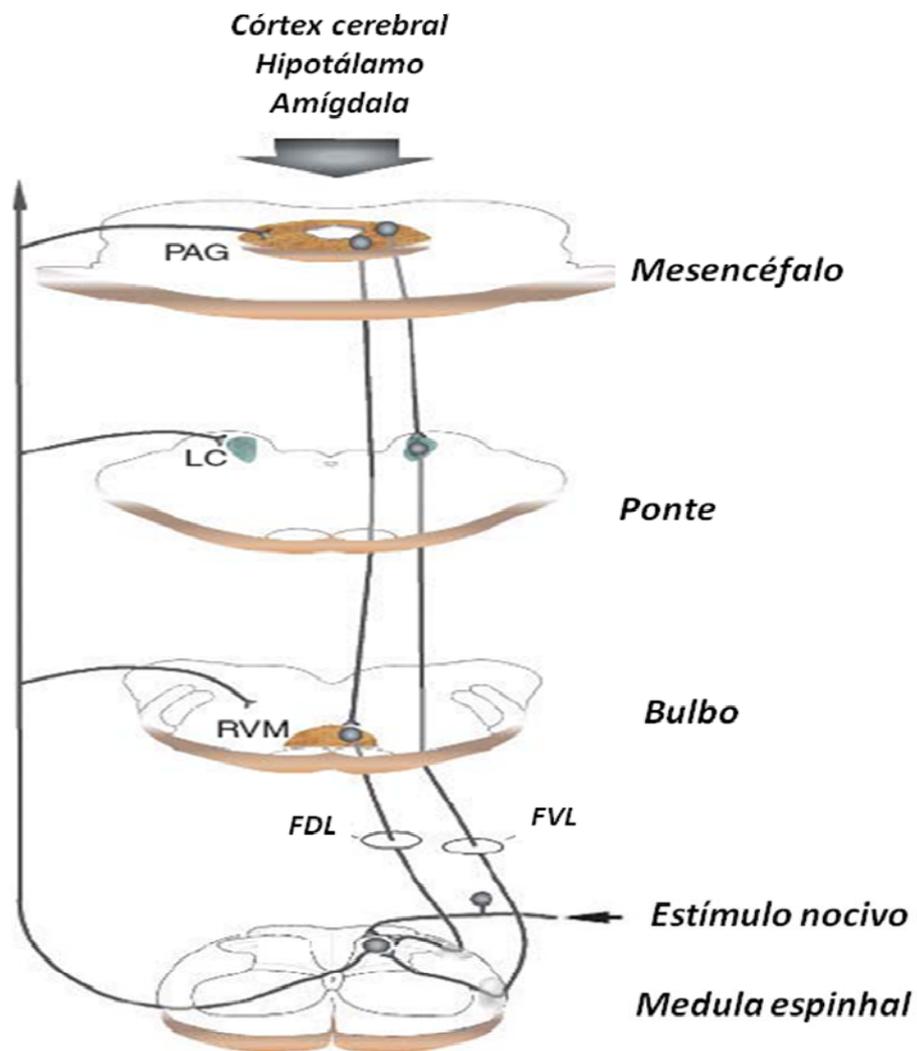


Figura 3 – Via descendente da nociceção. Principais áreas envolvidas no controle descendente da dor. FDL: funículo dorso-lateral; FVL: funículo ventro-lateral; RVM: bulbo (medulla) rostro-ventral; LC: locus coeruleus; PAG: substância cinzenta periaquedutal. Fonte: adaptado de Ren, Dubner, 2009.

1.2 DOR CRÔNICA

A dor pode se tornar persistente, resultando em estado de má adaptação, que ocorre por combinação de alterações nos eventos básicos da nociceção associado a disfunções de origem física, emocional, psicológica e social. Neste caso, a dor torna-se crônica e perde o caráter protetor necessário à manutenção da integridade do organismo, como em casos de dor aguda.

As dores de origem inflamatórias e as neuropáticas são transtornos clínicos, que afetam pacientes promovendo dores crônicas que permanecem ainda nos dias atuais sem uma terapia realmente eficiente na grande maioria dos casos. Ambos processos são caracterizados por estados de hipersensibilidade no foco ou gatilho da lesão e na área adjacente (WOOLF, SALTER, 2000).

A dor neuropática, segundo a IASP, é desencadeada como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial, ou seja, ela envolve mecanismos fisiológicos complexos resultantes de lesão primária ou disfunção de estruturas do sistema somatosensorial, que podem acometer raízes e nervos periféricos, nervos cranianos, medula espinhal ou encéfalo (LOESER, TREEDE, 2008). Apesar da incidência da dor neuropática não ser conhecida no Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 20% da população adulta em países desenvolvidos são acometidos por algum tipo de dor crônica, sendo que em torno de 1 a 3% destas pessoas apresentam algum tipo de dor neuropática (BOWSER, 1993; DWORKIN et al., 2003; IRVING, 2005). Cerca de 50% desses indivíduos ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, o que compromete de modo significativo tanto a qualidade de vida como a capacidade produtiva (CHONG, BAJWA, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado importante envolvimento de receptores glutamatérgicos, principalmente receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em processos de dor neuropática (MAO et al., 1992; DICKENSON et al., 1997; YOSHIMURA, YONEHARA, 2006). Além disso, estudos recentes demonstraram que as células gliais participam ativamente dos processos nociceptivos crônicos por apresentarem vários receptores relevantes e sintetizarem vários mediadores, os quais podem regular a atividade neuronal (HAYDON, 2001; GUO, SCHLUSENER, 2007; MILLIGAN, WATKINS, 2009). Desta forma, existe interação neurônio-glia significativa, na qual as células gliais podem ser ativadas em resposta a mediadores liberados por neurônios, resultando na liberação de citocinas, bradicinina (BK), prostaglandinas (PGs), aminoácidos excitatórios, entre outros, que, por sua vez, irão atuar em neurônios, aumentando a excitabilidade neuronal através da liberação de SP e neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (OKA, HORI, 1999; HALASSA et al., 2007; POCOCK, KETTENMANN, 2007). O reconhecimento dessas propriedades funcionais das células gliais evidencia a participação destas células em processos de dor neuropática (para revisão ver WATKINS et al., 2001; WATKINS, MAIER, 2003; CAMPANA, 2007; DeLEO et al., 2007; SCHOLZ, WOOLF, 2007).

Alterações drásticas no fenótipo celular das fibras aferentes primárias, como o aumento ou redução da expressão de moléculas, tais como neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores, contribuem para os fenômenos de sensibilização periférica e central, bem como revelam o efeito analgésico de algumas substâncias (para revisão ver WOOLF et al., 2004; MILLIGAN, WATKINS, 2009).

Várias dessas mudanças funcionais e estruturais que ocorrem na periferia acarretam redução do limiar de ativação de neurônios do corno dorsal da medula espinhal, contribuindo assim para o processo de sensibilização central. Nesse sentido, após a lesão de nervos, descargas ectópicas periféricas repetitivas promovem a liberação de glutamato e de SP, que, ao interagirem com receptores NMDA e NK1, respectivamente, sensibilizam os neurônios secundários medulares, que são importantes na amplificação e persistência de quadros hiperalgésicos (WOOLF, SALTER, 2000; MILLIGAN, WATKINS, 2009). Sabe-se que a degeneração de fibras nociceptivas A δ e C resultam no brotamento de fibras A β na lâmina II da medula espinhal, conferindo às fibras mielinizadas a possibilidade de interagir com neurônios nociceptivos de segunda ordem. Apesar dos mecanismos envolvidos na reorganização sináptica espinhal não serem totalmente conhecidos, esse fenômeno pode explicar como estímulos táteis inócuos passam a ser percebidos como dolorosos, propiciando o aparecimento de alodinia mecânica (MANNION et al., 1996). Parte dos fenômenos de hiperexcitabilidade encontrados na dor neuropática pode envolver a redução do controle descendente inibitório espinhal. Isto pode ser evidenciado através de redução da eficácia do sistema opióide e de seus receptores, associado ao aumento da expressão de mediadores, como a colecistocinina, na medula espinhal parecem contribuir efetivamente para a dor neuropática (ZHANG et al., 1998; 2000). Evidências recentes sugerem ainda importante participação de influências supra-espinhais na dor neuropática. No entanto, os mecanismos envolvidos precisam ser mais bem esclarecidos, uma vez que foi apontada tanto a redução do controle inibitório quanto o aumento da facilitação descendente (VANDERAH et al., 2000; OSSIPOV, PORRECA, 2009).

Considerando a complexa relação existente entre a lesão e o aparecimento da dor, não é surpreendente que o controle farmacológico efetivo da dor neuropática ainda constitua um grande desafio para a comunidade médico-científica, uma vez que esta síndrome mostra-se resistente a uma série de fármacos com propriedades analgésicas marcadas em quadros de dor aguda. Devido ao seu caráter multifatorial, uma série de sinais e sintomas da dor neuropática pode variar ao longo do tempo, sendo que quanto mais cedo for impedida a persistência dos estímulos nociceptivos ectópicos, maiores serão as chances de alcançar algum sucesso

terapêutico analgésico. Entre as opções de tratamento disponíveis encontram-se os opióides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), adesivos tópicos de lidocaína e capsaicina, além de fármacos que não foram originalmente desenvolvidos para o tratamento de dor, como anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos (ATTAL et al., 2010).

De maneira geral, o emprego do arsenal terapêutico atual raramente resulta na eliminação da dor. Ao contrário, muitos pacientes continuam refratários aos tratamentos, seja pela persistência das crises ou por efeitos colaterais indesejáveis (ATTAL et al., 2010). Diante deste contexto, o emprego de terapias combinadas vem sendo indicado para se obter um melhor efeito analgésico, utilizando doses menores de cada droga, objetivando reduzir os efeitos colaterais. No entanto, a necessidade de se identificar novos fármacos que possam ser úteis no tratamento da dor neuropática continua sendo de grande interesse.

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

Ao longo dos anos, os humanos encontraram na natureza meios para atender suas necessidades básicas, muitos dos quais serviram de remédio para o tratamento de várias doenças. Os primeiros registros documentam o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia. No Egito, o Papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., documenta mais de 700 medicamentos, a maioria originária de plantas. Existem evidências que praticamente todos os povos utilizavam preparados a base de plantas para assegurar sua sobrevivência (LORENZI, MATOS, 2002; NEWMAN et al., 2008).

Durante a Idade Média, a propriedade terapêutica das plantas era atribuída à existência de substâncias presentes nelas. Com o desenvolvimento e o avanço da química orgânica, houve a possibilidade de isolamento e purificação, a partir de extratos brutos, da(s) substância(s) responsável(eis) pelo(s) efeito(s) biológico(s) predominante(s). Esse grupo de substâncias, derivado do metabolismo secundário, denominou-se “princípios ativos” (LORENZI, MATOS, 2002; PERES, 2003; NORTON, 2005; ITOKAWA et al., 2008).

Os metabólitos secundários eram considerados produtos de excreção do vegetal sem possuir função definida, sendo negligenciado seu estudo científico por muito tempo. Posteriormente, foi sugerido que essas substâncias serviriam para proteção das plantas frente

às diversas situações, como defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios ultravioletas, atração de polinizadores, entre outros (VERPOORTE, 2000; PERES, 2003; SAKLANI, KUTTI, 2008).

A disponibilidade de princípios ativos quimicamente puros, juntamente aos avanços obtidos na fisiologia experimental no século XIX, possibilitou a descrição precisa dos efeitos destas substâncias, bem como a investigação de seu mecanismo de ação. Por exemplo, a atropina, princípio ativo isolado da planta *Atropa belladonna*, que contribuiu para a fundamentação da neurotransmissão colinérgica e para a teoria dos receptores farmacológicos; a reserpina, princípio ativo extraído da planta *Rauwolfia serpentina*, que propiciou o embasamento da neurotransmissão adrenérgica, serotoninérgica e dopaminérgica. Outros princípios ativos que seguem a linha da atropina e reserpina são: o curare (isolado de *Chondodendron tomentosum*), nicotina (espécies de *Nicotiniana*), ergotamina (espécies do Ergot), cocaína (espécies de *Erythroxylum*), morfina (*Papaver somniferum*), glicosídeos cardíacos (espécies de *Digitalis*), efedrina (*Ephedra sinica*); além de uma diversidade de outros princípios ativos isolados de plantas (FARNSWORTH, 1966; GILANI, RAHMAN, 2005; NEWMAN, 2008).

É crescente a utilização de princípios ativos oriundos de plantas medicinais como importantes ferramentas farmacológicas e também para a indústria no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo a dor (RISHTON, 2008).

Estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas. Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial nos últimos anos na utilização de fitofármacos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças (CALIXTO et al., 1998; 2000; 2005; GILANI, RAHMAN, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, devido à pobreza e à falta de acesso aos medicamentos modernos, a maioria da população que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais como atenção primária à saúde (WHO, 1999; 2000; 2002; 2008; CALIXTO, 2000; GOLENIOWSKI et al., 2006; PHILLIPSON, 2007).

Entretanto, mesmo com a evidente utilização na clínica, poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para a confirmação de sua qualidade, segurança e eficácia. De acordo com o exposto, é crescente a importância da pesquisa e descoberta de novos compostos de interesse terapêutico a partir de recursos naturais.

1.4 *COMBRETUM* – O GÊNERO

As plantas do gênero *Combretum*, pertencentes à família das Combretáceas, estão amplamente distribuídas em todo mundo. A família Combretaceae consiste de 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum*, possuindo aproximadamente 370 espécies comumente utilizadas na medicina popular. Encontram-se amplamente distribuídas em diversas regiões da África e apresenta aspecto variado, incluindo principalmente árvores, arbustos ou trepadeiras (McGAW et al., 2001).

A população do sul da África emprega essas plantas sob a forma de decoctos ou infusões (planta seca ou, mais raramente, folhas frescas), para o tratamento de doenças como diarreia, gripe, sífilis e gonorréia, febre, hipertensão e edema, e tratamento de diversos tipos de dores, como dores abdominais, nas costas, ouvido, dente e cabeça. Adicionalmente, essas espécies são utilizadas no tratamento tópico de feridas e infecções na pele, em forma de pomadas constituídas de matéria vegetal seca. Foi demonstrado que algumas espécies de *Combretum*, como *C. zeyheri* também são utilizadas para tratar tumores estomacais (FYHRQUIST, 2007; McGAW et al., 2001).

Vários estudos envolvendo espécies do gênero *Combretum* têm sido realizados e recentemente têm-se evidenciado propriedades antimicrobianas, citotóxicas e antiproliferativas referentes aos extratos e também aos compostos isolados do gênero *Combretum*. Angeh et al. (2007) demonstraram que triterpenos isolados do extrato das folhas de *Combretum imberbe* apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; atividade anti-inflamatória e antiproliferativa e citotóxica contra células das linhagens K-562, L-929 e HeLa.

Outro estudo demonstrou que o ácido mólico, um glicosídeo isolado de *Combretum molle*, foi capaz de, em ratos, causar bradicardia, hipotensão e vasodilatação dependente do endotélio. Além disso, foi demonstrado que o composto apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos de edema de pata, contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de placa quente (OJEWOLE, 2008a,b).

Estudos fitoquímicos têm sido realizados com diferentes espécies do gênero *Combretum*, as quais possuem vários compostos químicos bioativos. Alguns desses compostos ou classe de compostos são: taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas, triterpenos, glicosídeos e derivados de fenantreno (FYHRQUIST, 2007).

1.5 *COMBRETUM LEPROSUM* MART

Uma das espécies de *Combretum* encontrada no Brasil, nos estados do norte e nordeste, caatinga e pantanal matogrossense (MARINHO et al., 2002; CHAVES et al., 2007) é a *Combretum leprosum* Mart (Figura 1). Esta planta foi catalogada pelo botânico alemão Carl Friedrich Philipp von Martius, em 1867, e é um arbusto conhecido popularmente pelos nomes de mofumbo, cipoaba e carne-de-vaca. Na medicina popular, infusões preparadas com as partes aéreas (tronco, folhas e flores) e raízes de *C. leprosum* são utilizadas como cicatrizante, para o tratamento de hemorragias, como sedativo, (FACUNDO et al, 2005), antitussígeno, expectorante (AGRA et al., 2007) e antiofídico (FERNANDES et al., 2007).



Figura 4 – Partes aéreas de *Combretum leprosum*. Folhas, flores e frutos.

A partir das folhas e raízes de *Combretum leprosum* foram isolados o ácido arjunólico, o ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o TTHL, que é um triterpeno pentacíclico. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (FACUNDO et al., 1993; 2005).

Medeiros et al. (2003) demonstraram que tanto o extrato etanólico da raiz de *C. leprosum* quanto um triterpeno isolado desta planta, o ácido arjunólico, reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, verificou-se que o extrato hidroalcoólico da casca desta espécie, administrado pela via oral, apresenta atividade ansiolítica e administrado pela via intraperitoneal apresenta atividade depressora central e

relaxante muscular (ALMEIDA et al., 2003). No mesmo ano, Meneses et al (2003) demonstraram que o extrato etanólico das cascas da planta apresentam atividade protetora da mucosa gástrica, quando avaliado no modelo de úlcera induzida pela indometacina.

Em 2005, Facundo e colaboradores verificaram que o extrato das raízes de *C. leprosum* inibe a atividade das enzimas butiril e acetilcolinesterases. Adicionalmente, verificou-se que o extrato das frutas de *C. leprosum* é capaz de inibir a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu*, bem como a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*, resultados estes que corroboram com uso popular desta planta como antiofídico (FERNANDES et al., 2007).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório de pesquisa demonstraram que o extrato etanólico obtido das flores de *Combretum leprosum* promoveu efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção química e térmica. Seu efeito antinociceptivo depende, pelo menos em parte, de mecanismos que envolvem o sistema opióide e serotoninérgico (via 5-HT_{1A/1B} e 5-HT_{2B}) Ainda neste estudo, foi demonstrado que o triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), isolado desta planta, apresentou efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (PIETROVSKI et al., 2006). Em 2008, Da Silva demonstrou que tanto o extrato etanólico quanto o TTHL obtidos das flores de *C. leprosum* possuem potente atividade anti-inflamatória administrados por via tópica, visto que foram capazes de inibir o edema e a migração celular em processos inflamatórios na pele.

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo das últimas décadas, o estudo dos mecanismos da nocicepção e a determinação de potenciais alvos para terapias específicas contra a dor, incluindo as de origem neuropática, tornaram-se duas das principais prioridades de organizações de saúde, bem como das empresas farmacêuticas (LUO, 2004).

A terapia convencional para o controle da dor, principalmente no que diz respeito ao tratamento/controle de estados crônicos de dor, se baseia no uso de analgésicos opióides, anti-inflamatórios não-esteroidais, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. Todavia, os efeitos indesejáveis promovidos por esses fármacos oferecem obstáculos à utilização dos mesmos na terapêutica (ATTAL et al., 2010).

O TTHL, isolado das flores de *C. leprosum*, apresentou efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção (dor) aguda (PIETROVSKY et al., 2006). De maneira geral a dor é de difícil controle e os fármacos disponíveis na clínica apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais. Nesse sentido, novos estudos são necessários para aprimorar o conhecimento acerca do efeito antinociceptivo do TTHL em modelos de nocicepção aguda e avaliar se o TTHL apresenta atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção crônica. Assim como, é importante esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo deste triterpeno.

Desta forma, estes resultados poderão servir como informações científicas que validam o conhecimento etnofarmacológico acerca do uso popular de *Combretum leprosum*. Adicionalmente, o triterpeno isolado desta planta, o TTHL, pode se tornar molécula de interesse para o desenvolvimento de fármacos terapêuticamente úteis para o controle de dor aguda e crônica.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito antinociceptivo do triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL) isolado de flores de *Combretum leprosum* em modelos experimentais de dor aguda e crônica em camundongos, bem como os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito antinociceptivo do TTHL, por meio de modelos de nocicepção aguda, como: ácido acético, formalina e glutamato;
- Avaliar o decurso temporal do efeito antinociceptivo do TTHL administrado pela via oral na nocicepção induzida pelo glutamato;
- Investigar, por meio de ferramentas farmacológicas, alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do TTHL, entre eles, o sistema opioide, serotoninérgico e as vias de sinalização comuns a estes sistemas;
- Investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do TTHL administrado intratecalmente, por meio do uso de agonistas e antagonistas e por meio de ensaio de ligação específica (binding) para avaliar a interação com receptores e transportadores de glutamato;
- Avaliar o efeito da administração intratecal do TTHL sobre a atividade locomotora de camundongos, utilizando o teste de campo aberto (open field);
- Avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias no efeito antinociceptivo do TTHL administrado pela via oral ou intratecal;

- Verificar a atividade antinociceptiva do TTHL na nocicepção crônica, utilizando o modelo de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO TTHL

As flores de *Combretum leprosum* foram coletadas em Cocalzinho-Viçosa, estado do Ceará, Brasil, em maio de 2007. A espécie foi identificada pelo Prof. Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará) em maio de 2007 e um exemplar encontra-se catalogado (n. 12446) no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A obtenção do extrato etanólico, assim como o isolamento, a purificação e a identificação dos compostos isolados de *C. leprosum* foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia. Primeiramente, as flores foram secas e trituradas, e então submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente. Foram realizadas três extrações sucessivas, utilizando 5 litros de etanol em cada extração, e então o produto foi submetido à destilação do solvente sob pressão reduzida, fornecendo 58,3 g de extrato.

Parte do extrato etanólico obtido nessa primeira etapa foi submetido a um fracionamento em coluna filtrante, utilizando como adsorvente sílica gel e tendo como fases solventes: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se assim as respectivas frações. A fração clorofórmio foi então submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, tendo como fase fixa gel H da Merck e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em polaridade crescente. Em quatro frações (27-30), extraídas com hexano:acetato de etila (3:7) foi observada a presença de um precipitado branco, através de recristalização com éter etílico foi feita a purificação da substância identificada por métodos químicos e espectroscópicos (NRM) como sendo o triterpeno 3β , 6β , 16β -tridroxilup-20(29)-eno (TTHL; Figura 1; FACUNDO et al., 1993).

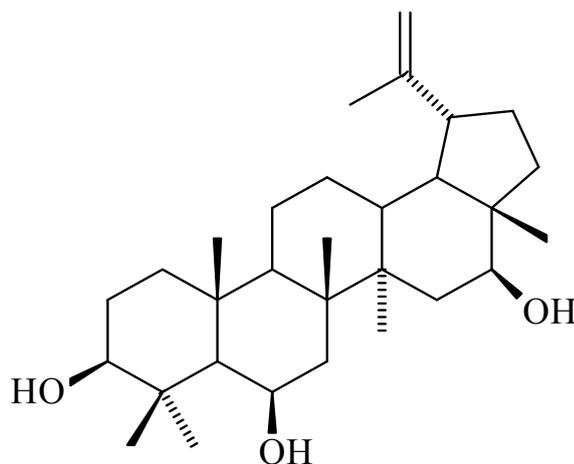


Figura 5 – Estrutura do 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno. PM: 458 g/mol. Fonte: adaptado de Facundo et al., 1993.

4.2 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo: PP00162). Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25 a 35 g) de ambos os sexos, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro e 12 h escuro (luzes acesas às 6 h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais, machos e fêmeas distribuídos de forma homogênea entre os grupos experimentais, foram mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos. Além disso,

4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL

4.3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória viscero-somática e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al., 1959; VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN, HOLE, 1997). Desta forma, primeiramente avaliou-se o efeito do TTHL frente a este teste. Para tanto, os animais foram pré-tratados com TTHL (0,01-10 mg/kg) pela via oral (v.o.). O grupo controle recebeu veículo (5% Tween 80/DMSO-10 ml/kg, v.o.). Após 60 min, a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (450 µl) de ácido acético (0,6%). Em seguida, os animais foram colocados em funis de vidros individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante 20 min. As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1999a; Le BARS et al., 2001).

4.3.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5%) em camundongos

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica, decorrente da estimulação direta das fibras nociceptivas e a de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR et al., 1985, TJØLSEN et al., 1992). A metodologia utilizada foi semelhante à descrita por Santos e Calixto (1997). Aos 60 min antes da injeção intraplantar/intradérmica (i.pl.) de formalina, os camundongos foram pré-tratados com TTHL (10-300 mg/kg, v.o) ou veículo (grupo controle – 10 ml/kg, v.o.). Posteriormente, 20 µl de

solução de formalina 2,5% foi injetada intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, sendo observado, individualmente, o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina.

4.3.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Uma vez que o sistema glutamatérgico é um dos mais importantes envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo, tanto em nível periférico quanto central (BEIRITH et al., 2002; JESSE et al, 2008), verificou-se o efeito do tratamento com TTHL administrado por via oral (v.o.), intraperitoneal (i.p.), intraplantar/intradérmica (i.pl.) e intratecal (i.t.), no modelo de nociceção induzida pelo glutamato. O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por Beirith et al. (2002) e Meotti et al. (2009). Os camundongos foram tratados com TTHL v.o (3-300 mg/kg, 60 min antes), i.p. (1-30 mg/kg, 30 min antes), i.pl. (3-30 µg/pata, co-administrado com o glutamato) ou i.t (30-300 µg/5 µl, 15 min antes). Animais do grupo controle receberam volume igual de veículo v.o. e i.p. (10 ml/kg), i.pl. (20 µl/pata) or i.t. (5 µl/sítio). Após os tratamentos com TTHL ou veículo, os animais foram injetados intraplantarmente (20 µL) com solução de glutamato (10 µmol/pata, preparado em salina; ou 20 µmol/pata, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 com NaOH) na pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparente, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 15 min e considerado como índice de nociceção.

Em outra série de experimentos, foi investigado o decurso temporal do efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) administrado 1, 2, 4, 6, 8 e 10 hs antes da injeção i.pl. de glutamato. Animais do grupo controle receberam o mesmo volume de veículo (10 ml/kg, v.o.) e foram observados nos mesmos intervalos de tempo.

4.4 ANÁLISE DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO TTHL

Os mecanismos pelos quais o TTHL (30 mg/kg, v.o), promove antinociceção foram avaliados utilizando o modelo de nociceção induzida pelo glutamato. As doses de todas as substâncias utilizadas foram escolhidas baseadas em dados descritos na literatura (SANTOS et al., 1999a e b; 2005; KASTER et al., 2005; MAIA et al., 2006; PIETROVSKI et al., 2006; LUIZ et al., 2007; BACKHOUSE et al., 2008; MEOTTI et al., 2009) ou selecionadas a partir de experimentos prévios realizados no laboratório.

4.4.1 Envolvimento do sistema opióide

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opióide na antinociceção promovida pelo TTHL, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não-seletivo de receptores opióides), CTOP (1 mg/kg, subcutaneamente [s.c.], antagonista seletivo de receptores μ -opióide), nor-binaltorfimina (1 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores κ -opióide) ou naltrindol (3 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores δ -opióide). Após 20 min, os animais receberam TTHL (30 mg/kg, v.o), morfina (2,5 mg/kg, s.c) ou veículo (10 ml/kg, v.o.). A resposta nociceptiva à injeção de glutamato i.pl. foi verificada 60 min após a administração de TTHL ou veículo e 30 min após o tratamento com morfina. Outros grupos de animais foram pré-tratados somente com veículo e 20 min após, receberam TTHL, morfina ou veículo, 60, 30 ou 60 min antes da injeção de glutamato, respectivamente (CATHELINE et al., 1999; KIM et al., 2000; JINSMAA et al., 2006; LUIZ et al., 2007).

4.4.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Para investigar o envolvimento da produção de serotonina endógena no efeito antinociceptivo do TTHL, camundongos foram pré-tratados com p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de serotonina) ou com veículo, uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. Após 20 min decorridos da última administração de PCPA, os animais receberam TTHL (30 mg/kg, v.o), morfina (2,5 mg/kg, s.c) ou veículo (10 ml/kg, p.o). A resposta nociceptiva à injeção de glutamato foi verificada 30 ou 60 min após a injeção de morfina, TTHL ou veículo. Em experimentos posteriores, foi avaliada a contribuição dos diferentes tipos de receptores de serotonina (5-HT). Para isso, os animais foram pré-tratados com WAY100635 (0,5 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A}), cetanserina (1 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptor 5-HT_{2A}), ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores 5-HT₃) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 20 min da administração dos antagonistas, os animais foram tratados com TTHL (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.) e como controles positivos foram utilizados: buspirona (5 mg/kg, i.p., agonista de receptor 5-HT_{1A}), DOI (1 mg/kg, i.p., agonista de receptor 5-HT₂) ou agmatina (3 mg/kg, i.p., o qual em resultados prévios de nosso laboratório teve seu efeito antinociceptivo revertido pela ondansetrona (SANTOS et al., 2005; LUIZ et al., 2007). A resposta nociceptiva ao glutamato foi avaliada 60 min após a administração de TTHL ou veículo e 30 min depois da administração dos agonistas.

4.4.3 Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

Os animais foram pré-tratados com L-arginina (600 mg/kg, i.p., precursor de óxido nítrico). Após 20 min os animais receberam TTHL (30 mg/kg, v.o.), L-NAME (20 mg/kg, i.p., inibidor da óxido nítrico sintase) ou veículo (10 ml/kg, v.o.). Outros grupos de animais receberam somente veículo (10 ml/kg, i.p.) e posteriormente, TTHL (30 mg/kg, v.o.), L-NAME (20 mg/kg, i.p., inibidor da óxido nítrico sintase) ou veículo (10 ml/kg, v.o.). A resposta nociceptiva à injeção de glutamato foi avaliada 60 min após a administração de TTHL ou veículo e 30 min após tratamento com L-NAME (MAIA et al., 2006).

4.4.4 Participação da proteína Gi

A fim de investigar o envolvimento da proteína Gi na atividade antinociceptiva do TTHL, camundongos foram pré-tratados pela via i.t. com toxina pertussis (PTX; 0,5 µg/sítio), um inativador da proteína Gi. O grupo controle foi pré-tratado com veículo (5 µl/sítio) pela via i.t. O experimento foi conduzido conforme previamente descrito por Sánchez-Blázquez e Garzón (1991) e Meotti et al. (2007). Sete dias após o pré-tratamento dos animais com PTX, os animais receberam veículo (10 ml/kg, v.o.), TTHL (30 mg/kg, v.o.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.). A resposta nociceptiva à injeção i.pl. de glutamato foi avaliada 60 min após a administração com TTHL ou veículo e 30 min após administração de morfina.

4.4.5 Envolvimento dos canais de K⁺

O próximo passo foi investigar o envolvimento de canais K⁺ na antinocicepção promovida pelo TTHL. Os animais foram pré-tratados com bloqueadores de canais de K⁺: tetraetilamônio (TEA, 1 µg/sítio, i.t.; bloqueador de canal de K⁺ voltagem-dependente); apamina (50 ng/sítio, i.t.; bloqueador de canal de K⁺ de baixa condutância ativado por cálcio); caribdotoxina (250 pg/sítio, i.t.; bloqueador de canal de K⁺ de alta condutância ativado por cálcio) ou glibenclamida (80 µg/sítio, i.t.; bloqueador de canal de K⁺ dependente de ATP) e após 15 min eles foram tratados com TTHL (30 mg/kg, v.o.), morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, v.o.) (STRONG, 1990; ARONSON, 1992; WELCH, DUNLOW, 1993; SANTOS et al., 1999b; MEOTTI et al., 2007). A resposta nociceptiva à injeção i.pl. de glutamato foi verificada 60 min após a administração de TTHL ou veículo e 30 min após administração de morfina.

4.5 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TTHL

4.5.1 Nociceção induzida pela injeção intratecal (i.t) de aminoácidos excitatórios e substância P

Com o objetivo de evidenciar mais diretamente a participação do sistema glutamatérgico no efeito antinociceptivo do TTHL em nível central, este triterpeno foi co-administrado com agonistas ionotrópicos e metabotrópicos de receptores glutamatérgicos ou substância P (SP) pela via i.t. O procedimento utilizado para a injeção intratecal foi similar ao descrito previamente por Hylden e Wilcox (1980). Após tricotomia da pele, os animais foram imobilizados manualmente e uma agulha conectada a uma microseringa de 25 µl foi inserida através da pele no espaço subdural entre as vértebras espinhais L5-L6. A resposta nociceptiva foi ocasionada pela administração intratecal no volume de 5 µl dos aminoácidos excitatórios e SP diluídos em solução salina. Primeiramente, TTHL (6,5-218 nmol/sítio) foi co-administrado intratecalmente com glutamato (aminoácido excitatório, 175 nmol/5 µl). Nos experimentos subsequentes, TTHL (65,5 nmol/sítio) foi co-injetado intratecalmente com NMDA (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio); trans-ACPD (agonista não-seletivo dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 10 nmol/sítio); AMPA (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), cainato (agonista seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo cainato, 110 pmol/sítio) ou substância P (SP, agonista preferencial de receptores NK₁, 100 pmol/sítio) (SCHEIDT et al., 2002; GADOTTI et al., 2006). Em outro grupo de animais, foi administrado veículo (5 µl/sítio) pela via i.t.. Imediatamente após a injeção das substâncias, os camundongos foram individualmente colocados em funis de vidro transparentes e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região inferior a injeção (patas posteriores, cauda e abdômen) foi cronometrado dentro do tempo padronizado para cada substância: glutamato 3 min; NMDA e SP 5 min; AMPA 1 min; cainato 4 min e trans-ACPD 15 min (URCA, RAIGORODSKI, 1988; SAKURADA et al., 1990; BRAMBILLA et al., 1996; BOXALL et al., 1998; SCHEIDT et al., 2002).

4.5.2 Injeção i.t. de antagonistas de receptores NMDA e metabotrópicos

Posteriormente, foi investigado se antagonistas de receptores NMDA e metabotrópicos: MK-801 (antagonista seletivo não competitivo de receptores NMDA) e (RS)-MCPG (antagonista não-seletivo de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I/grupo II) revertem a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD. Dessa forma, ambos antagonistas, MK-801 (3 nmol/sítio) e (RS)-MCPG (100 nmol/sítio) foram co-injetados intratecalmente com glutamato (175 nmol/sítio), NMDA (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio). A resposta nociceptiva (s) foi quantificada como descrito no item anterior.

4.5.3 Injeção i.t. de doses subativas de TTHL, antagonistas de receptores NMDA e metabotrópico

Com o objetivo de investigar o envolvimento de receptores NMDA e metabotrópicos no efeito antinociceptivo do TTHL, investigou-se o efeito sinérgico de doses subativas dos antagonistas NMDA (MK-801, 1 nmol/sítio) e metabotrópico (RS)-MCPG [30 nmol/sítio] + TTHL (6,5 nmol/sítio) sobre a nocicepção induzida pelos agonistas NMDA (450 pmol/sítio) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio). Para tanto, os animais receberam injeções intratecais (cada injeção de 2,5 µl, perfazendo o volume total de 5 µl), como descrito anteriormente. O grupo controle recebeu injeção i.t. de veículo (2,5 µl/i.t.) antes de cada agonista, NMDA ou trans-ACPD (2,5 µl/sítio). A resposta nociceptiva (s) foi quantificada como descrito no item 4.5.1.

4.5.4 Avaliação da atividade locomotora

A fim de avaliar o efeito do TTHL na atividade locomotora espontânea dos animais, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto (open-field; RODRIGUES et al., 2002). O campo aberto consiste em uma caixa de madeira medindo 40 × 60 × 50 cm. O chão da arena foi dividido em 12 quadrados, e o número de cruzamentos realizados pelos animais foi analisado durante 6 min. Quinze minutos antes do teste, os camundongos foram tratados com TTHL (65,5 e 218 nmol/sítio, i.t.) ou veículo (salina 5 µl/sítio, i.t.).

4.5.5 Ensaios de ligação específica de [³H]-L-glutamato

4.5.5.1 Preparação das membranas

A preparação das membranas foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por Emanuelli et al. (1998). Camundongos Swiss foram sacrificados por decapitação e tiveram seus encéfalos (exceto cerebelo) dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes (ml/g de tecido) de uma solução contendo sacarose (320 mM)/Tris-HCl (10 mM)/MgCl₂ (1 mM) e pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 1.000 x g durante 15 min. O sobrenadante (S1) dessa centrifugação foi separado e mantido em gelo. O precipitado foi ressuspensão no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente a 1.000 x g durante 15 min. O sobrenadante obtido dessa centrifugação foi misturado a S1 e o precipitado foi desprezado e a mistura centrifugada a 27.000 x g durante 15 min. O precipitado resultante foi ressuspensão em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM (pH 7,4) e centrifugado novamente a 27.000 x g durante 15 min (SOUZA, RAMIREZ, 1991), sendo que esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado resultante da terceira lavagem foi ressuspensão em tampão Tris/acetato 10 mM (pH 7,4). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

4.5.5.2 Ligação específica de [³H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camndongos

Os ensaios de ligação específica de [³H]-L-glutamato foram realizados na ausência de sódio, com intuito de verificar a ligação do glutamato aos seus receptores ou na presença de sódio, a fim de verificar a ligação do glutamato aos transportadores (os transportadores de glutamato dependem de sódio para exercerem atividade). O procedimento foi realizado conforme previamente descrito (DALCIN et al., 2007). Os ensaios de ligação específica foram realizados em triplicata em um volume total de 0,5 ml contendo 50 mM de tampão Tris–acetato (ensaio de ligação específica na ausência de Na⁺, pH 7,4) ou 50 mM de tampão Tris–acetato/120 mM NaCl (ensaio de ligação específica na presença de Na⁺, pH 7,4); 0,1 ml de membrana (50 µg de proteína), TTHL (0,01-1 mM) ou veículo (etanol 0,6%). Para o experimento de ligação específica de glutamato independente de sódio, foi utilizado NMDA 1 mM como controle positivo. E para o ensaio de ligação específica dependente de sódio foi utilizado o L-trans-2,4-dicarboxilato de pirrolidina (PDC; 50 µM), que é um inibidor dos transportadores de glutamato. Os controles não continham TTHL. Após 30 min de incubação a 30 °C com 40 nM de [³H]glutamato (0,3 µCi) as amostras foram filtradas à vácuo, os filtros foram lavados com 20 ml de tampão tris/acetato 10 mM gelado, bem secos e colocados em frascos próprios (vials) contendo 1 ml de líquido de cintilação para posterior determinação da radioatividade em cintilador beta (Packard Tri-Carb 2100TR). A radioatividade foi determinada utilizando valores de ligação não específica (10–20% da ligação total) obtidas pela adição de 40 µM de glutamato não-radioativo ao meio em experimentos paralelos. A ligação específica foi considerada como sendo a diferença entre a ligação (binding) total e ligação não-específica. Os resultados estão expressos como porcentagem dos valores da ligação específica.

4.6 PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Duas citocinas destacam-se quando se trata de dor e inflamação: a IL-1 β e o TNF- α . Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α contribuem diretamente para o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia (FERREIRA et al, 1988; DAVIS, PERKINS, 1994; CUNHA, FERREIRA, 2003, COUTAUX et al, 2005). Com o objetivo de avaliar a participação dessas citocinas no efeito antinociceptivo do TTHL utilizou-se o modelo de nocicepção induzida pela administração intratecal de IL-1 β e TNF- α . Os animais foram tratados com TTHL pela via oral (30 mg/kg) ou i.t. (65,5 nmol/sítio, co-administrado com as citocinas) ou com veículo (grupo controle – 10 ml/kg). Após 60 min da administração v.o. de TTHL ou veículo, os animais receberam injeção i.t. de IL-1 β (1 pg/sítio) ou TNF- α (0,1 pg/sítio). Imediatamente após a injeção das substâncias, os camundongos foram individualmente colocados em funis de vidro transparentes e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a região inferior a injeção (patas posteriores, cauda e abdômen) foi cronometrado durante 15 min (FERREIRA et al., 1999; SCHEIDT et al., 2002).

4.7 NEUROPATIA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO

O efeito do TTHL sobre a dor neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal contendo cetamina 100 mg/kg e xilazina 5 mg/kg. A anestesia foi mantida com anestésico inalatório isoflurano (1-2% em 100% de O₂) e após a verificação da anestesia, foi realizada incisão no membro inferior direito para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (SELTZER et al, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG, BASBAUM, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi amarrado com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 7.0 Prolone) que também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond). Sete dias após a

cirurgia avaliou-se o limiar nociceptivo mecânico dos animais conforme descrito no subitem 4.7.1. Após, os animais foram tratados durante 7 dias e do dia 10 até o dia 12, duas vezes ao dia, com veículo (10 ml/kg, v.o.) ou com TTHL (30 mg/kg, v.o.).

4.7.1 Estimulação mecânica

O limiar nociceptivo dos animais foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan et al. (1994). Através da superfície da tela de metal do assoalho da câmara de observação, uma série de filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças de 0,02; 0,07; 0,4; 0,6; 1,0; 1,4; 2,0 gramas foram aplicados perpendicularmente e em ordem crescente ou decrescente ao centro da superfície plantar da pata traseira dos animais, por um período máximo de 8 s, ou até que o animal apresentasse resposta nociceptiva de retirada da pata, seguida de lambida e/ou chacoalhar da mesma. O teste teve início com o filamento de 0,4 g. Na ausência de resposta, filamentos de força maior foram aplicados consecutivamente até que ocorresse a resposta de retirada da pata. Caso o filamento de 0,4 g produzisse a resposta, após intervalo de 2 minutos, filamentos de força menor foram aplicados até que ocorresse novamente a resposta de retirada da pata. Os dados coletados utilizando este método, denominado *up-and-down* e proposto por Dixon (1980), foram utilizados para calcular a força correspondente a 50% do limiar de retirada da pata (em gramas, g) e foi determinado antes e após a realização dos protocolos experimentais. Reduções no limiar de retirada da pata caracterizam o aparecimento de *alodinia mecânica*.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI_{50} (doses de TTHL que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em

relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI_{50} foram obtidos através do método de regressão não linear (função sigmoidal com slope variável) utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via ou duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls ou Tukey HSD (software STATISTICA/StatSoft), respectivamente, quando apropriado. Para os dados não-paramétricos, a significância estatística foi determinada por Mann-Whitney seguida pelo teste de Kruskal Wallis.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL

5.1.1 Efeito do TTHL sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,6%) em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que o TTHL (0,01-10 mg/kg), administrado pela via oral (v.o.), inibiu significativamente o número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI_{50} (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 0,15 (0,03-0,8) mg/kg e inibição de $69 \pm 3\%$.

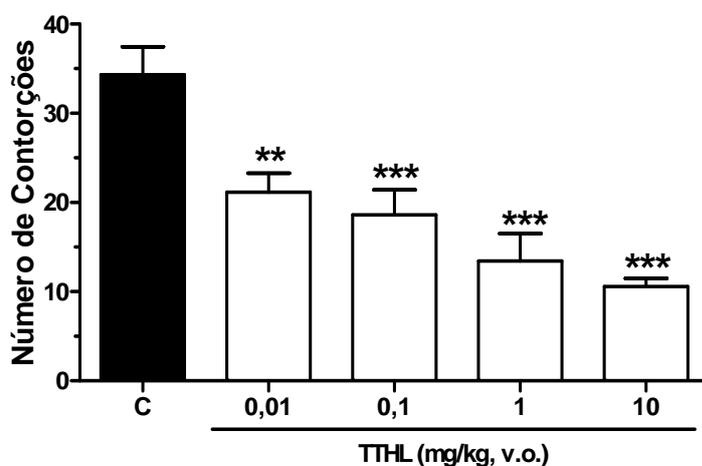


Figura 6 – Efeito antinociceptivo do TTHL administrado pela via oral em relação à nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão das médias (E.P.M.) Os símbolos denotam os níveis de significância ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (C: coluna preta; animais que receberam somente veículo via oral [5% Tween 80/DMSO] e ácido acético i.p.). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.1.2 Efeito do TTHL na nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

Observa-se na Figura 7 que o TTHL (10-300 mg/kg, v.o.) foi capaz de inibir tanto a fase neurogênica (1ª fase: 0-5 min) quanto a fase inflamatória (2ª fase: 15-30 min) da nociceção induzida pela formalina. As DI_{50} s calculadas foram 108 (73-163) e ~30 mg/kg e inibição de $63 \pm 5\%$ e $51 \pm 9\%$, respectivamente para a primeira e segunda fase.

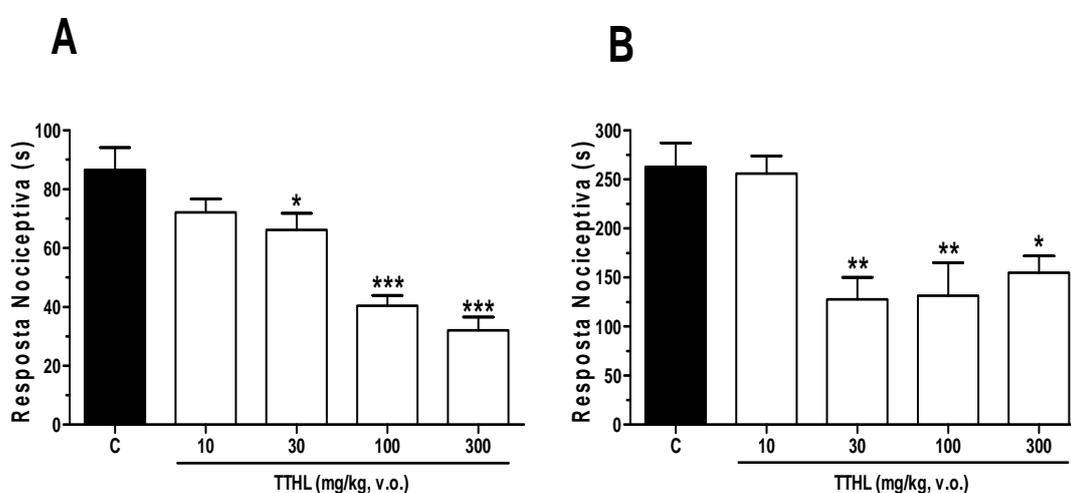


Figura 7 – Efeito do TTHL administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nociceção induzida pela injeção intradérmica de formalina 2,5% em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (C: coluna preta; animais que receberam somente injeção de veículo via oral [5% Tween 80/DMSO] e formalina i.pl.). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.1.3 Efeito do TTHL na nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 8 (A, B, e C) demonstram que o TTHL administrado sistemicamente pela via intraperitoneal (1-30 mg/kg, i.p.), periféricamente (3-30 μ g/pata, co-administrado com o glutamato intradérmica) ou centralmente pela via intratecal (10-300 μ g/i.t.), promoveu inibição significativa e de maneira dependente da dose a

nocicepção induzida pela injeção intraplantar/intradérmica (i.pl.) de glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$ preparado em salina). Os valores de DI_{50} foram 5 (4-8) mg/kg; 16 (12-20) $\mu\text{g/pata}$; e 107 (66-174) $\mu\text{g/i.t.}$ com inibições de $78 \pm 6\%$, $82 \pm 4\%$ e $77 \pm 8\%$, respectivamente (Figura 8A, B e C).

O TTHL (3-300 mg/kg), quando administrado via oral, também promoveu redução significativa da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$, preparado em salina com o pH ajustado para 7,0 com NaOH) com DI_{50} de 19 (13-27) mg/kg e inibição de $56 \pm 3\%$ na dose de 30mg/kg (Figura 9A). Quando o glutamato foi administrado em diferentes tempos após o tratamento com TTHL (30mg/kg, v.o.), verificou-se que o triterpeno apresenta pico de resposta antinociceptiva 1 h (inibição de $59 \pm 6\%$), resposta esta que perdurou até 6 h (inibição de $37 \pm 6\%$) após o tratamento (Figura 9B).

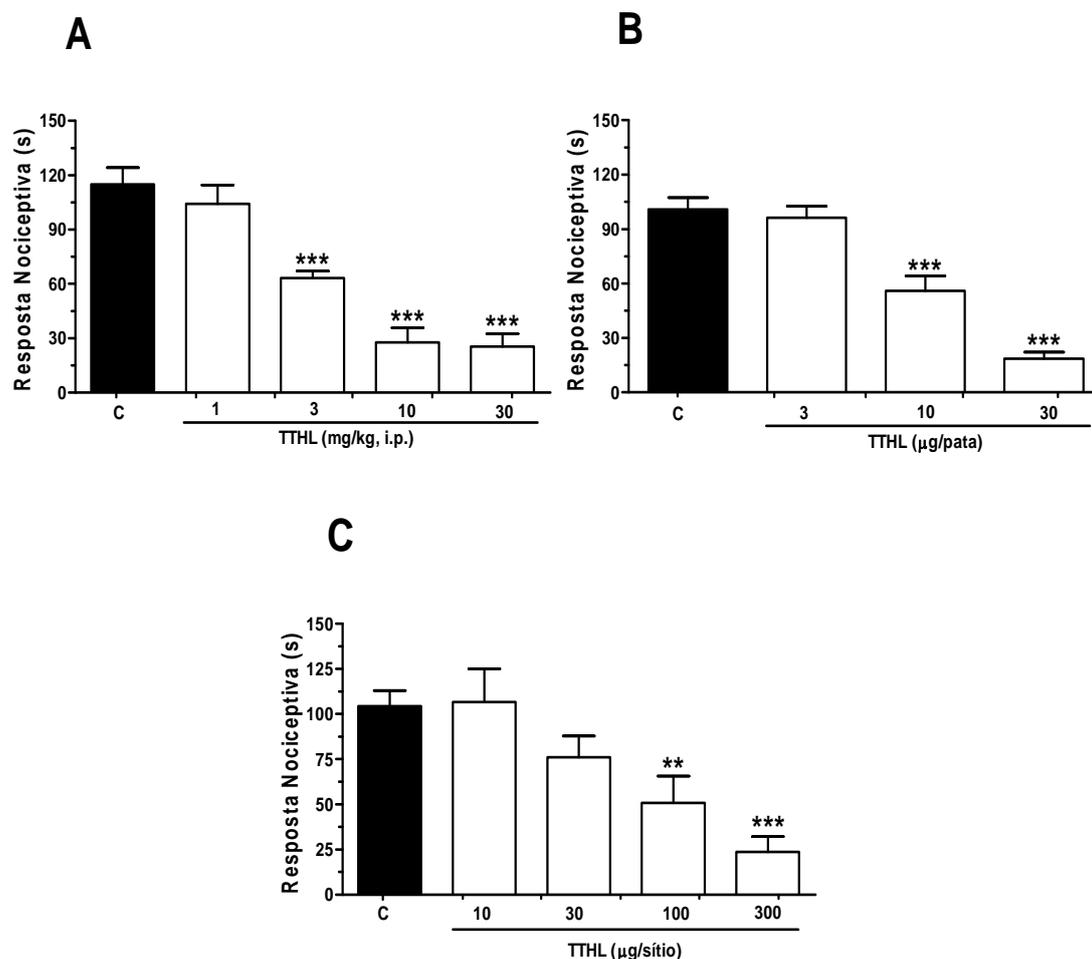


Figura 8 – Efeito do TTHL administrado i.p. (1-30 mg/kg, painel A), i.pl. (3-30 µg/kg, painel B) ou i.t. (10-300 µg/sítio) em relação à nocicepção induzida pela injeção de glutamato i.pl. (C; 10 µmol/pata, preparado em salina) em camundongos. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância **P < 0,01 and ***P < 0,001 comparado ao grupo controle (coluna preta; animais que receberam somente injeção de veículo via oral [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.pl.) . ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls .

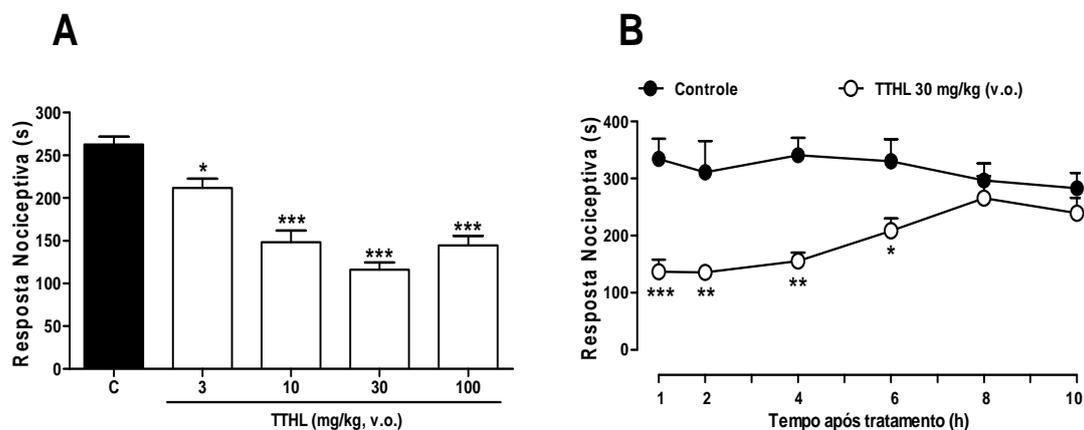


Figura 9 – Efeito do TTHL administrado via oral em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 μ mol/pata, preparado em salina e pH ajustado para 7,0 com NaOH) em camundongos. (A) Curva dose-resposta (TTHL 3-100mg/kg, v.o.). (B) Decurso temporal do efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.). Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais o E.P.M. O grupo controle (C), coluna preta ou círculo cheio, indicam os animais tratados v.o com veículo antes do glutamato i.pl. Os símbolos denotam os níveis de significância * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (C). (A) ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO TTHL

5.2.1 Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do TTHL

O pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.; antagonista não-seletivo de receptores opióide, painel A), CTOP (1 mg/kg, s.c.; antagonista seletivo de receptores μ -opióide, painel B), nor-binaltorfimina (1 mg/kg, i.p.; antagonista seletivo de receptores κ -opióide, painel C) ou naltrindol (3 mg/kg, s.c.; antagonistas de receptores δ -opióide, painel D), reverteu significativamente não somente o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c), como também o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Figura 10)

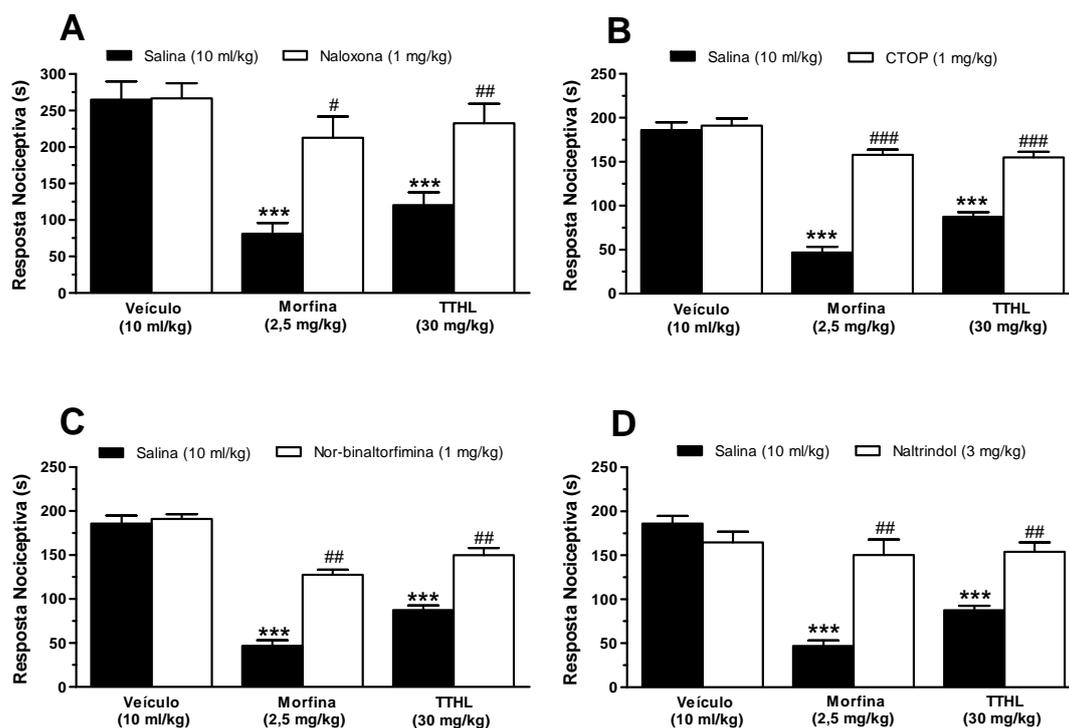


Figura 10 – Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p., A), CTOP (1 mg/kg, s.c., B), nor-binaltorfimina (1 mg/kg, i.p., C) ou naltrindol (3 mg/kg, s.c., D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) dos antagonistas opióides. Os símbolos denotam os níveis de significância *** P < 0,001 comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.pl.), # P < 0,05; #### P < 0,001 e ## P < 0,01 comparado ao grupo que recebeu morfina; ### P < 0,01 e #### P < 0,001 comparado ao grupo TTHL. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD.

5.2.2 Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do TTHL

O pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos) reverteu significativamente o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) e TTHL (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Figura 11A). Adicionalmente, o pré-tratamento dos animais com WAY100635 (0,5 mg/kg, s.c.; antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) e cetanserina (0,3 mg/kg, i.p.; antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2A}), além de reverter o efeito antinociceptivo de seus respectivos agonistas, bupiriona (5 mg/kg, i.p.; agonista de receptores 5-HT_{1A}) e DOI (1 mg/kg, i.p.; agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}), reverteu a antinocicepção causada pelo TTHL (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Figura 11B e C). Contudo, o pré-tratamento

dos animais com ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p.; antagonista seletivo de receptores 5-HT₃ receptor) em dose que reverte a antinociceção causada pela agmatina (3mg/kg, i.p.; SANTOS et al., 2005) não foi capaz de alterar o efeito nociceptivo promovido pelo TTHL (30 mg/kg, p.o., Figura 11D).

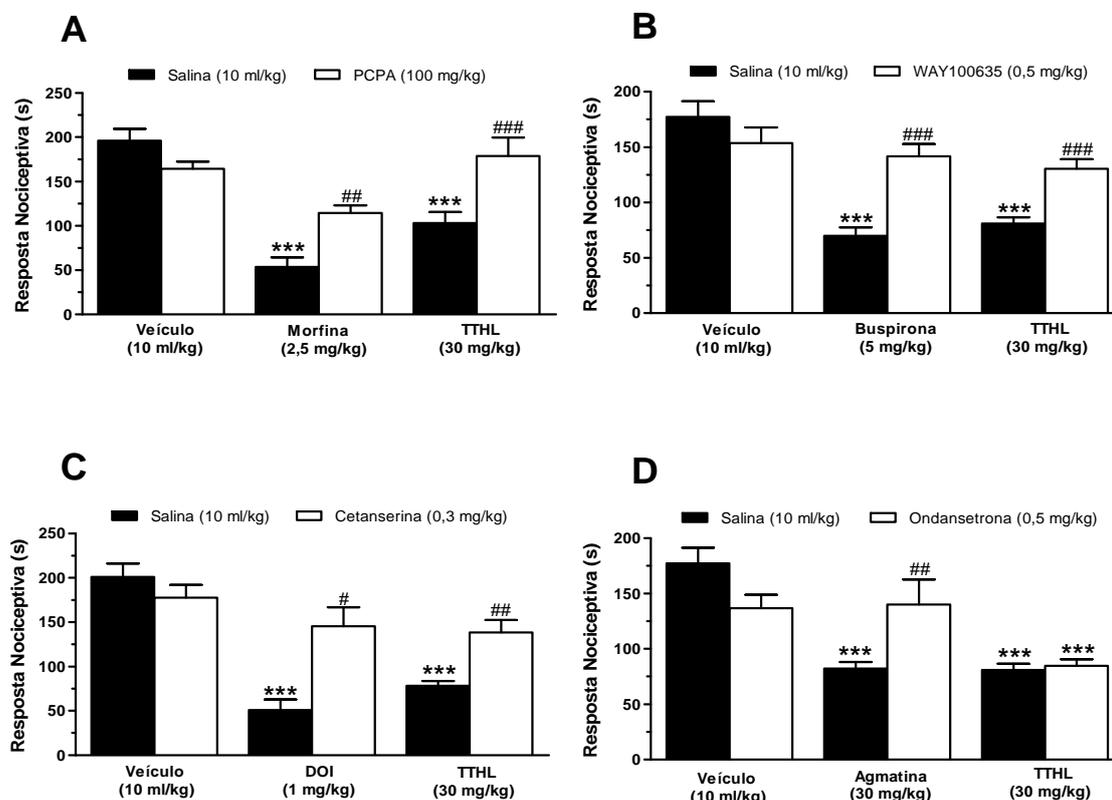


Figura 11 – Efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos, painel A), WAY 100635 (0,5 mg/kg, s.c., painel B), cetanserina (0,3 mg/kg, i.p., painel C) e ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p., painel D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.), morfina (2,5 mg/kg, s.c., A), bupiriona (5 mg/kg, i.p., B), DOI (1 mg/kg, i.p., C) e agmatina (30 mg/kg, i.p., D) em relação à nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) de PCPA ou antagonistas serotoninérgicos. Os símbolos denotam os níveis de significância *** P < 0,001 comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.p.), # P < 0,05; ## P < 0,01 e ### P < 0,001 comparado ao grupo que recebeu DOI, morfina ou agmatina e bupiriona, respectivamente; ### P < 0,01 e #### P < 0,001 comparado ao grupo TTHL. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD.

5.2.3 Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do TTHL

O pré-tratamento sistêmico de camundongos com L-arginina (600 mg/kg, i.p.; pré-cursor do óxido nítrico), reverteu o desenvolvimento da antinociceção promovida pelo L-NAME (20 mg/kg, i.p.; inibidor da enzima óxido nítrico sintase), porém não alterou o efeito

antinociceptivo promovido pelo TTHL no modelo de nociceção induzida pelo glutamato (Figura 12).

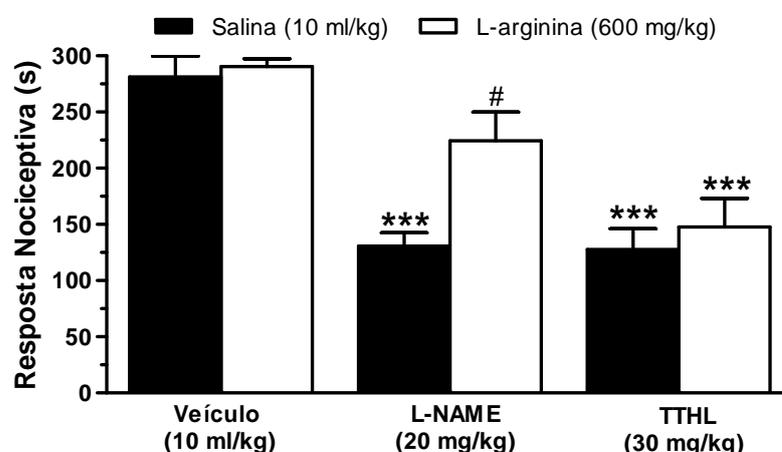


Figura 12 – Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e do L-NAME (20 mg/kg, i.p.) em relação à nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) de L-arginina. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.pl.), # $P < 0,05$ comparado ao grupo que recebeu L-NAME. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD.

5.2.4 Envolvimento da proteína Gi no efeito antinociceptivo do TTHL

Os resultados ilustrados na Figura 13 mostram que a inativação da proteína Gi, induzida pela injeção i.t. de toxina pertussis (0,5 μ g/sítio, i.t., 7 dias antes), aboliu completamente o efeito antinociceptivo promovido pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) e pelo TTHL (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nociceção induzida pelo glutamato. Além disso, o pré-tratamento com toxina pertussis não causou efeito *per se* no modelo de nociceção induzida pelo glutamato.

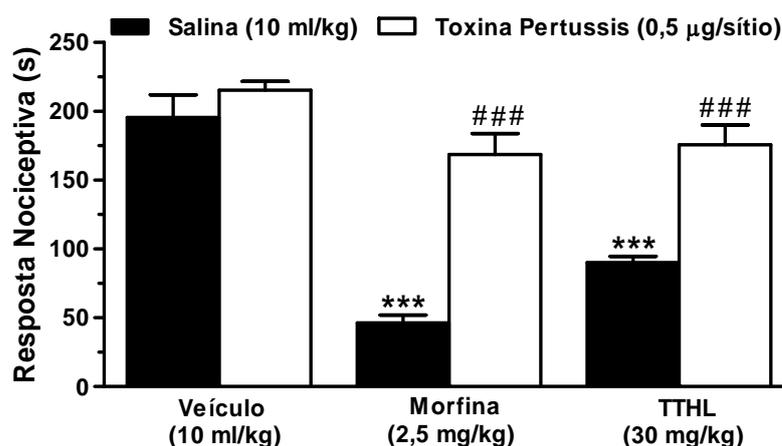


Figura 13 – Efeito do pré-tratamento com toxina pertussis (0,5 µg/sítio, i.t., 7 dias antes) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 µmol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) de toxina pertussis. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.pl.), ### $P < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu morfina ou TTHL. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD.

5.2.5 Envolvimento de canais de K^+ no efeito antinociceptivo do TTHL

Os dados representados na Figura 14 demonstram que a administração i.t. de tetraetilamônio (1 µg/sítio; bloqueador de canal de K^+ voltagem-dependente, painel A), caribdotoxina (250 pg/sítio; bloqueador de canal de K^+ de alta condutância regulado por Ca^{2+} , painel C) e glibenclamida (80 µg/sítio; bloqueador de canal de K^+ dependente de ATP, painel D) reverteram significativamente o efeito antinociceptivo promovido pelo TTHL. Por outro lado, a apamina (50 ng/sítio, bloqueador de canal de K^+ de baixa condutância regulado por Ca^{2+} , painel B) não alterou a antinocicepção promovida pelo TTHL. Adicionalmente, todos os bloqueadores preveniram o efeito antinociceptivo da morfina (2,5 mg/kg, s.c.). A administração dos bloqueadores de canal de K^+ não afetou *per se* a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (Figura 14A, B, C e D).

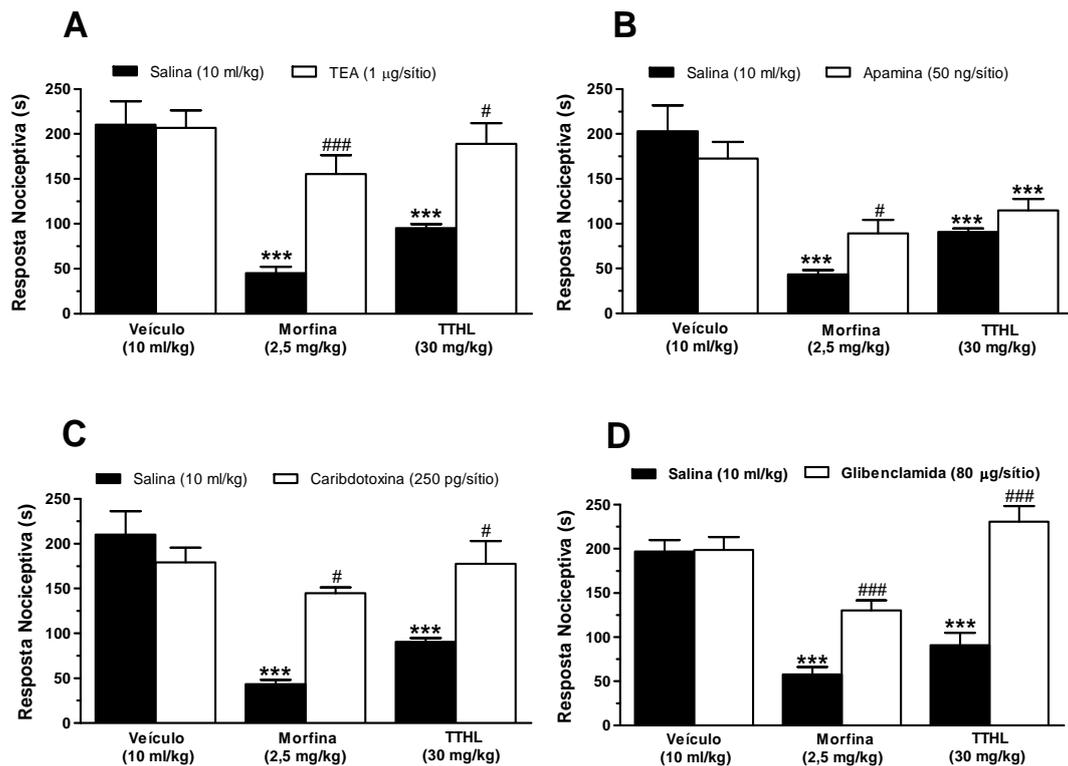


Figura 14 – Efeito do pré-tratamento com tetratilamônio (TEA; 1 µg/sítio, painel A), apamina (50 ng/sítio, painel B), caribdotoxina (250 pg/sítio, painel C) e glibenclamida (80 µg/sítio, painel D) sobre o efeito antinociceptivo do TTHL (30 mg/kg, v.o.) e da morfina (2,5 mg/kg, s.c.) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 µmol/pata) em camundongos. Cada coluna representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. em ausência (colunas pretas) ou presença (colunas brancas) dos bloqueadores de canal de K⁺. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0.001$ comparado ao grupo controle (animais injetados com veículo [5% Tween 80/DMSO] e glutamato i.pl.), # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu morfina; # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu TTHL. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey HSD.

5.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TTHL

5.3.1 Efeito do TTHL na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que o TTHL administrado intratecalmente (6,5-218 nmol/sítio, co-administrado com glutamato) reduziu

significativamente e de maneira dependente da dose a nociceção induzida pela injeção i.t de glutamato. O valor de DI_{50} calculado foi de 54,5 (51,2-57,8) nmol/sítio e inibição de $51 \pm 6\%$ na dose de 65,5 nmol/sítio. Para a realização dos experimentos subsequentes, a dose de 65,5 nmol/sítio de TTHL foi escolhida.

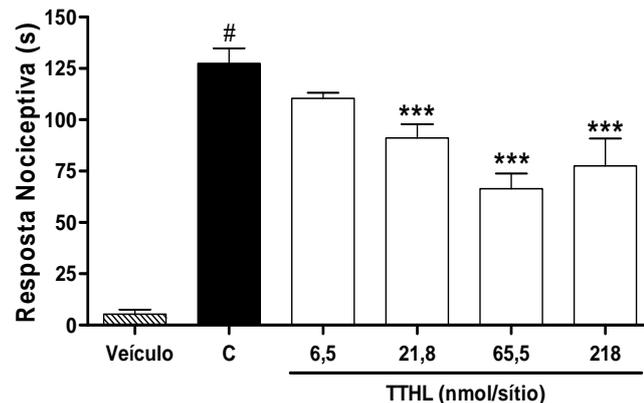


Figura 15 – Efeito da administração i.t. de TTHL (6,5-218nmol/sítio, co-administrado) sobre a nociceção induzida pelo glutamato (C, 175nmol/sítio, i.t). Cada coluna representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (C: coluna preta), # $P < 0,001$ comparado ao veículo (V: coluna hachurada). ANOVA de uma via seguida do teste de Student Newman-Keuls.

Constata-se na Figura 16 que o TTHL (65,5 nmol/sítio, co-administrado i.t. com cada agonista) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pelo NMDA, trans-ACPD e SP, porém não alterou a resposta nociceptiva induzida pelo AMPA e cainato. A inibição observada foi de $81 \pm 7\%$; $79 \pm 7\%$ e $81 \pm 11\%$ para o NMDA, trans-ACPD e SP, respectivamente.

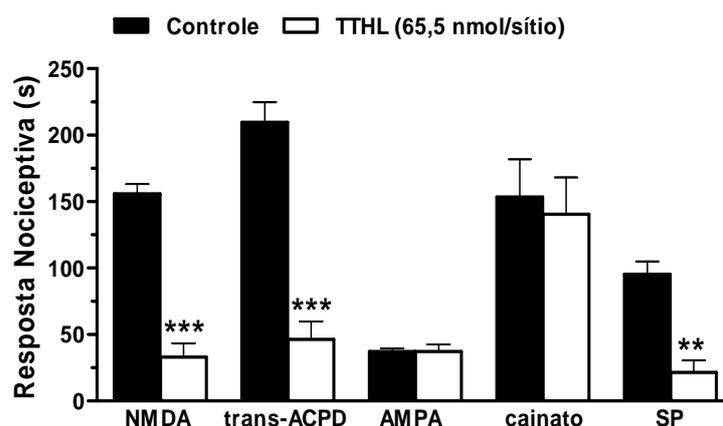


Figura 16 – Efeito da administração i.t. de TTHL (65,5 nmol/sítio, co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA (450 pmol/sítio), trans-ACPD (10 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), cainato (110 pmol/sítio) e SP (100 pmol/sítio) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0,001$ comparado aos seus respectivos controles (NMDA, trans-ACPD, AMPA, cainato e SP: coluna preta). ANOVA de uma via seguido de teste de Student Newman-Keuls.

5.3.2 Efeito da injeção intratecal de MK-801 e (RS)-MCPG sobre a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato, NMDA ou trans-ACPD

Primeiramente, avaliou-se o efeito da co-injeção de MK-801 (antagonista seletivo e não-competitivo de receptores NMDA, 3 nmol/sítio) ou (RS)-MCPG (antagonista não seletivo de receptores metabotrópicos do grupo I/grupo II, 100 nmol/sítio) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato. Verificou-se que o comportamento nociceptivo induzido pelo glutamato (175 nmol/sítio, i.t) foi reduzido significativamente por ambos antagonistas, com inibições de $78 \pm 10\%$ para o MK-801 e $63 \pm 15\%$ para o (RS)-MCPG (Figura 17).

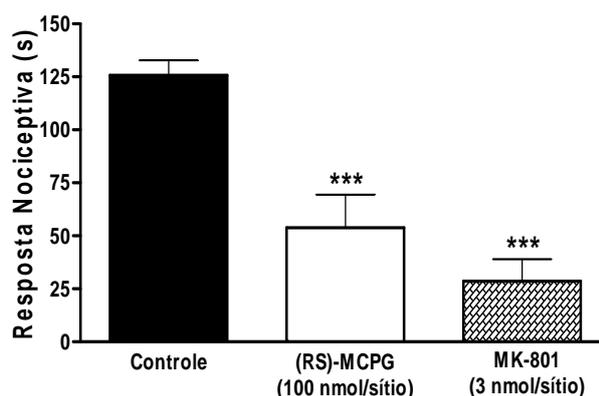


Figura 17 – Efeito da administração i.t. de (RS)-MCPG (100 nmol/sítio) ou MK-801 (3 nmol/sítio) (co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de glutamato (C; 175 nmol/sítio) em camundongos. Cada coluna representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (C: coluna preta). ANOVA de uma via seguido de teste de Student Newman-Keuls.

Os resultados ilustrados na Figura 18 demonstram os efeitos da co-administração i.t de MK-801 ou (RS)-MCPG com NMDA (450 pmol/sítio, Figura 18A) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio, Figura 18B). A resposta nociceptiva induzida pelo NMDA foi inibida pela co-injeção i.t de MK-801 (inibição de $77 \pm 11\%$), mas não foi alterada pelo (RS)-MCPG (Figura 18A). Por outro lado, a resposta nociceptiva induzida pelo trans-ACPD foi reduzida por ambos antagonistas (RS)-MCPG ou MK-801. A inibição observada foi de $77 \pm 9\%$ e $37 \pm 9\%$ para o (RS)-MCPG e MK-801, respectivamente (Figura 18B). Além disso, a injeção de MK-801 ou (RS)-MCPG não foi capaz de induzir *per se* resposta nociceptiva quando comparado aos animais tratados com veículo (5 μ l/sítio) (resultados não mostrados).

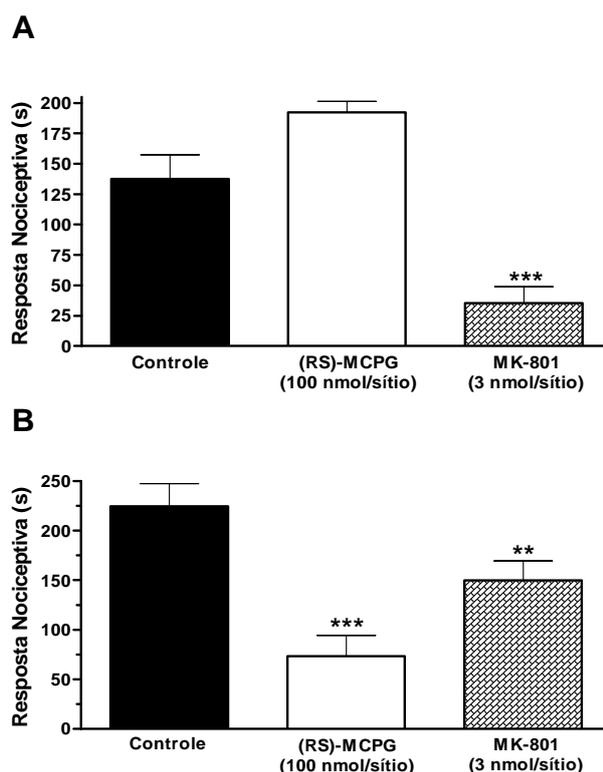


Figura 18 – Efeito da administração i.t. de (RS)-MCPG (100 nmol/sítio) ou MK-801 (3 nmol/sítio) (co-administrado) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t de NMDA (450 pmol/sítio, painel A) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio, painel B) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado aos seus respectivos controles (NMDA ou trans-ACPD: coluna preta). ANOVA de uma via seguido de teste de Student Newman-Keuls.

5.3.3 Efeito da associação de doses subativas de TTHL, MK-801 e (RS)- MCPG sobre resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA ou trans-ACPD

Os resultados apresentados na Figura 19 mostram o efeito da associação de doses subativas de MK-801 (1 nmol/i.t.) e TTHL (6,5 nmol/i.t.) ou (RS)-MCPG (30 nmol/i.t.) sobre a nocicepção induzida pelo NMDA (450 pmol/i.t.) ou trans-ACPD (10 nmol/i.t.) (Figura 19A e B). Quando administrados sozinhos em doses subativas, nem o MK-801, (RS)-MCPG e nem o TTHL foram capazes de alterar a nocicepção induzida pelo NMDA ou trans-ACPD (Figura 19A e B). Porém, a associação de doses subativas de MK-801 (1 nmol/i.t.) e TTHL (6,5 nmol/i.t.) produziram efeito antinociceptivo sinérgico (inibição de $73 \pm 5\%$) sobre a resposta nociceptiva induzida pelo NMDA (Figura 19A). Além disso, a associação de doses subativas

de MK-801 (1 nmol/i.t.) e (RS)-MCPG (30 nmol/i.t.) ou (RS)-MCPG e TTHL reduziu em 33 ± 3 e $38 \pm 4\%$, porém não significativamente, a resposta nociceptiva induzida pelo NMDA (Figura 19A).

A associação de doses subativas de (RS)-MCPG (30 nmol/i.t.) com TTHL (6,5 nmol/i.t.) promoveu efeito antinociceptivo sinérgico (inibição de $78 \pm 7\%$) sobre a nocicepção induzida pelo trans-ACPD em camundongos (Figura 19B). Contudo, a administração de doses subativas de MK-801 (1 nmol/i.t.) com (RS)-MCPG (30 nmol/i.t.) ou MK-801 com TTHL não alteraram significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo trans-ACPD.

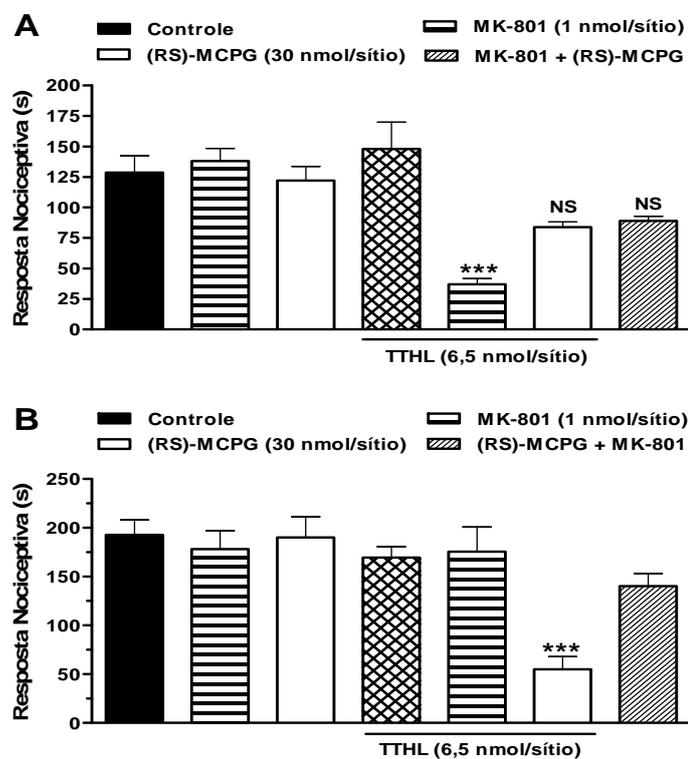


Figura 19 – Efeito de doses subativas de MK-801 (1 nmol/sítio), (RS)-MCPG (30 nmol/sítio), TTHL (6,5 nmol/sítio), MK-801 (1 nmol/sítio) com TTHL (6,5 nmol/sítio), (RS)-MCPG (30 nmol/sítio) com TTHL (6,5 nmol/sítio) ou MK-801 (1 nmol/sítio) com (RS)-MCPG (30 nmol/sítio) (co-administração i.t.) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t de NMDA (450 pmol/sítio, painel A) ou trans-ACPD (10 nmol/sítio, painel B) em camundongos. Cada coluna representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância **P < 0,01 e ***P < 0,001 e não-significante (NS) comparado aos seus respectivos controles (NMDA ou trans-ACPD: colunas pretas). ANOVA de uma via seguida de teste de Student Newman-Keuls.

5.3.4 Efeito do TTHL sobre a ligação específica de [³H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camundongos

Os dados apresentados na Figura 20 demonstram que o TTHL (0,01-1 mM) alterou significativamente a ligação específica do [³H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camundongo, incubadas em meio sem Na⁺ (Figura 20A) ou contendo Na⁺ (Figura 20B), quando comparado ao grupo veículo (etanol 0,6%). As CI₅₀ (concentração que inibe 50% do efeito máximo) foram de 0,06 (0,04-0,09) mM e 0,07 (0,05-0,1) mM na ausência ou presença de Na⁺, respectivamente.

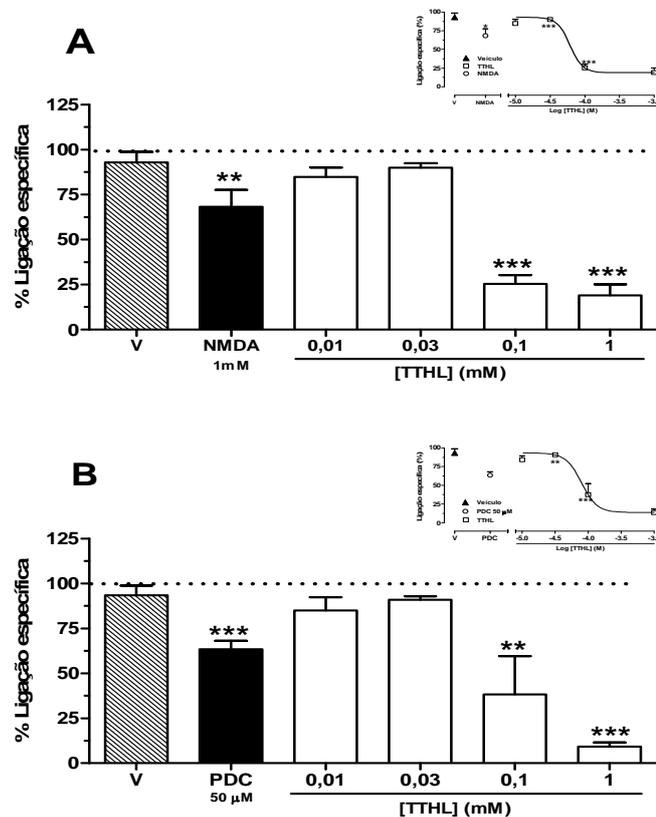


Figura 20 – Efeito do TTHL sobre a união específica de [³H]-L-glutamato (na ausência de Na⁺, painel A; na presença de Na⁺, painel B) em membranas de encéfalo de camundongos. Cada coluna representa a média de 3 a 4 experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata, e as linhas verticais representam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância ***P < 0,001 e **P < 0,01 comparados ao grupo veículo (etanol 0,6%). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.4 EFEITO DO TTHL SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA

A administração i.t de TTHL (65,5 e 218 nmol/sítio) não afetou a atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto quando comparado aos animais que receberam veículo (5% Tween 80/DMSO). As medias \pm E.P.M. do número de cruzamentos foi de 104 ± 4 para o grupo veículo; 104 ± 12 para a dose de 65,5 nmol/sítio e 95 ± 7 para a dose de 218 nmol/sítio de TTHL.

5.5 EFEITO DO TTHL NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

A figura 21 (A e B) mostra que o tratamento dos animais com TTHL, tanto administrado via i.t. (65,5 nmol/sítio, co-administrado) quanto pela v.o. (30 mg/kg) inibiu significativamente a nocicepção causada pela injeção i.t. de TNF- α e IL-1 β . As inibições foram de $91 \pm 4\%$ e $50 \pm 10\%$ para TNF- α e $80 \pm 11\%$; $42 \pm 10\%$ para IL-1 β , para a via i.t. e oral, respectivamente.

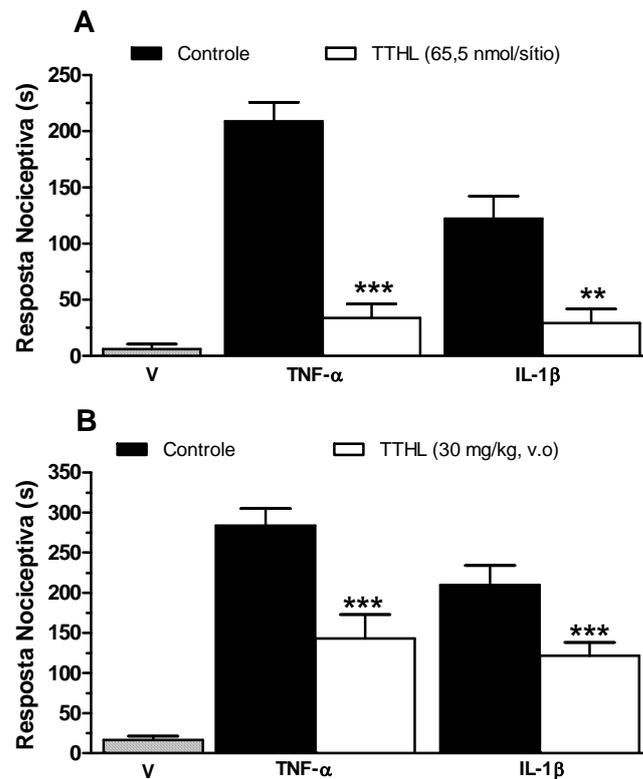


Figura 21 – Efeito do TTHL administrado i.t. (65,5 nmol/sítio, co-administrado com as citocinas, painel A) ou administrado v.o. (30 mg/kg, painel B) na nociceção induzida pela injeção intratecal de TNF- α ou IL-1 β (0,1 pg/sítio, 1 pg/sítio, respectivamente) em camundongos. Cada coluna representa a média de 9 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância ***P < 0,001 e **P < 0,01 comparado ao grupo controle (TNF- α ou IL-1 β : colunas preta). ANOVA de uma via seguido de teste de Student Newman-Keuls.

5.6 EFEITO DO TTHL NA DOR CRÔNICA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO

O tratamento agudo com TTHL (30 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o limiar de retirada da pata perante o estímulo mecânico (filamentos de Von-Frey) na 2^a e 4^a hs após a sua administração (inibição de $59 \pm 12\%$ e $46 \pm 5\%$ respectivamente) (Figura 22A). O tratamento crônico com TTHL (30 mg/kg, v.o.) durante 7 dias (2 vezes ao dia) demonstrou redução significativa do limiar de retirada da pata dos camundongos. Posteriormente, o tratamento foi suspenso durante dois dias, onde a reversão da dor devido ao tratamento foi

anulada. Finalmente, retomando o tratamento, a inibição é restabelecida (Figura 22B), confirmando desta forma, o efeito antinociceptivo do triterpene neste modelo de dor crônica.

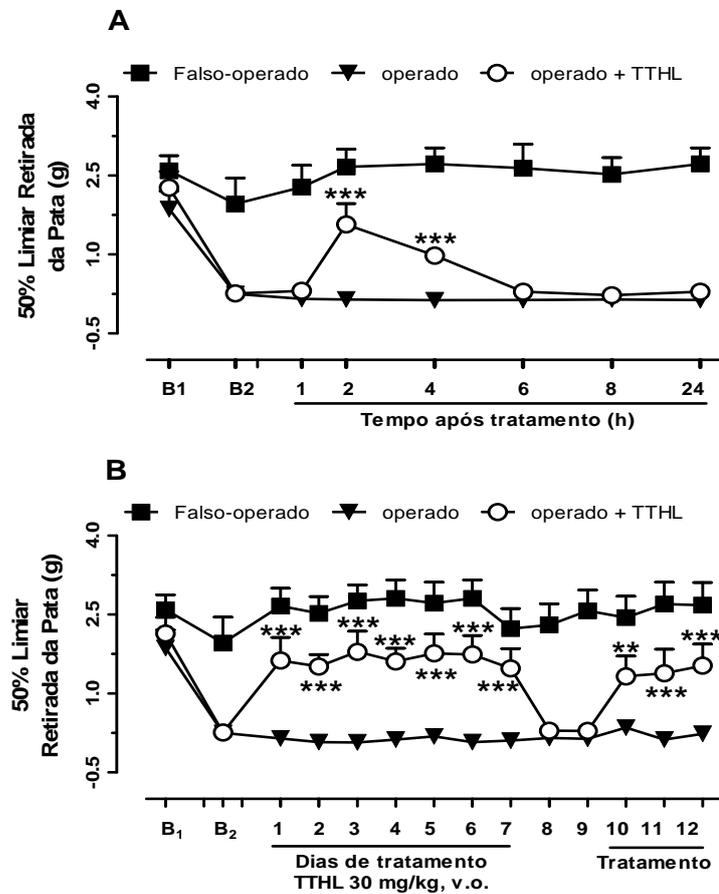


Figura 22 – Efeito do tratamento agudo (painel A) e crônico (painel B) do TTHL (30 mg/kg, v.o) no modelo de dor neuropática induzido pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. O grupo B1 representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia e o grupo B2 representa o limiar mensurado 7 dias após a cirurgia sem que os animais tivessem recebido tratamento. Os grupos representam a média de 9 animais e as linhas verticais o erro padrão das médias (E.P.M.). Os símbolos denotam a significância *** $P < 0,001$ comparado ao grupo falso-operado (A); *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo operado (B). Análise não-paramétrica Mann-Whitney seguida de teste de Kruskal-Wallis.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que o triterpeno pentacíclico isolado de *Combretum leprosum* inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. A administração sistêmica via oral de TTHL produziu significativa inibição das fases neurogênica e inflamatória da nocicepção causada pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina e também inibiu a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, efeito este que perdurou até a 6ª h após o tratamento.

Vários estudos demonstraram que o ácido acético promove a liberação de substâncias endógenas (cininas, prostanóides, óxido nítrico, substância P, TNF- α , IL-1 β e IL-8) pelos mastócitos e macrófagos residentes na cavidade peritoneal, os quais estimulam os neurônios sensoriais primários e induzem a resposta comportamental típica caracterizada pela contorção abdominal dos animais (COLLIER et al., 1968; VINEGAR et al., 1979; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Feng et al. (2003) demonstraram que a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético induz aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal. Dessa forma, os dados obtidos e descritos até então, sugerem que o efeito antinociceptivo do TTHL possa estar relacionado à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios ou, ainda, por inibir a posterior ativação do sistema glutamatérgico induzidos pelo ácido acético.

Como o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é considerado um teste de baixa especificidade, confirmou-se também o efeito antinociceptivo do TTHL em outros modelos de nocicepção.

Posteriormente, utilizou-se o modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina. Este modelo apresenta duas fases: a 1ª fase ou fase neurogênica e a 2ª fase ou fase inflamatória. A nocicepção neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos e a nocicepção inflamatória é mediada pela combinação da sensibilização periférica e da medula espinal (TJØLSEN et al., 1992). No presente estudo, demonstrou-se que o TTHL inibiu significativamente tanto a fase neurogênica quanto à inflamatória induzida pela injeção i.pl. de formalina em camundongos.

Demonstrou-se também que a administração via oral de TTHL produziu inibição significativa da resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato. Estudos realizados tanto em humanos (NORDLIND et al., 1993; WARNCKE et al., 1997;

GAZERANI et al., 2006) quanto em animais de laboratório (DAVIDSON et al., 1997; CAIRNS et al., 1998; DAVIDSON, CARLTON, 1998) têm demonstrado que aminoácidos excitatórios, como o glutamato, contribuem para o desenvolvimento e/ou manutenção da dor. Carlton et al. (1995) demonstraram que a injeção i.pl. de L-glutamato induz hiperalgesia em ratos. Adicionalmente, a injeção i.pl. de agonistas específicos dos receptores glutamatérgicos, NMDA, AMPA, cainato ou DHPG (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos) promovem hiperalgesia mecânica e térmica passível de ser bloqueada pelos seus respectivos antagonistas (BHAVE et al., 2001; ZHOU et al., 1996; 2001). Beirith et al. (2002) verificaram que a nocicepção causada pelo glutamato parece envolver locais de ação periférica, espinhal e supra-espinhal sendo mediada tanto por receptores NMDA quanto receptores não-NMDA, bem como por via dependente de óxido nítrico (NO). Além disso, vários estudos têm demonstrado que receptores de aminoácidos excitatórios, como NMDA, estão envolvidos na transmissão nociceptiva, auxiliando tanto no desenvolvimento quanto na manutenção do quadro doloroso (FERREIRA et al., 1999). Então, os dados obtidos no presente estudo, assim como os dados da literatura, sugerem que a inibição causada pelo TTHL da nocicepção induzida por glutamato pode estar relacionada à sua interação com o sistema glutamatérgico ou inibição da produção de NO.

Com o objetivo de investigar alguns dos mecanismos envolvidos na resposta antinociceptiva produzida pela administração sistêmica, via oral, de TTHL, utilizou-se o modelo de nocicepção induzida pelo glutamato uma vez que este triterpeno promove antinocicepção significativa e com boa reprodutibilidade.

Apesar de vários estudos demonstrarem a relação entre o glutamato e a via do NO (GARTHWAITE, 1991; MELLER, GEBHART, 1993; MELLER et al., 1996; SANTOS et al., 2005), a via L-arginina/NO não parece estar envolvida no efeito antinociceptivo do TTHL. Esta afirmação deriva do fato de que o pré-tratamento com o substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS), L-arginina, em dose que não produz efeito significativo na nocicepção induzida pelo glutamato, reverteu significativamente a antinocicepção causada pelo L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), porém não afetou a antinocicepção promovida pelo TTHL.

Sabe-se que a sensação dolorosa é modificada por sistemas endógenos descendentes inibitórios, como o sistema serotoninérgico e o opioidérgico, por meio da liberação de serotonina (5-HT) e opióides endógenos (β -endorfina, encefalina, dinorfina), respectivamente. Estas substâncias podem agir tanto em neurônios sensoriais de primeira ou de segunda ordem,

promovendo redução da resposta nociceptiva (MILLAN, 2002; YOSHIMURA, FURUE, 2006).

Com relação ao sistema opioidérgico, os receptores opióides estão amplamente distribuídos em vários tecidos periféricos (WITTERT et al., 1996) e nervos cutâneos (STEIN et al., 1990; STÄNDER et al., 2002), bem como no sistema nervoso central (SNC), principalmente em vias envolvidas na transmissão dolorosa como o corno dorsal da medula espinhal (LAMOTTE et al., 1976; NINKOVIC et al., 1982; LAO et al., 2008) e células do gânglio da raiz dorsal (GRD) (BOTTICHELLI et al., 1981). Tem sido demonstrada a existência de três tipos de receptores opióides: μ , κ e δ . Eles pertencem à classe dos receptores acoplados a proteína G e a subfamília dos receptores de rodopsina. A sinalização intracelular promovida pela ativação destes receptores promove acoplamento à proteína G inibitória (G_i), com consequente inibição da adenilato ciclase (AC), bloqueio de canais de cálcio e abertura de canais de potássio. E desta forma, atenuam a propagação dos potenciais de ação, a excitabilidade dos nociceptores, e liberação de neuropeptídeos excitatórios como: o glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, resultando em antinociceção ou analgesia (STEIN, SCHÄFER, MACHELSKA, 2003). Dados da literatura demonstram que os três receptores opióides podem mediar a analgesia espinhal, sendo responsáveis por ações antinociceptivas diretas e indiretas dos agonistas opióides (RUSSELL et al., 1987; TAKEMORI, PORTOGHESE, 1993; BUDAI, FIELDS, 1998; MILLAN, 1999; 2002; CHEN, PAN, 2006; CHEN et al., 2007).

No presente estudo demonstrou-se que o sistema opióide parece estar envolvido no efeito antinociceptivo promovido pelo TTHL. Esta observação tem sua base no fato de que a naloxona, antagonista não-seletivo de receptores opióides, o CTOP (antagonista seletivo de receptores μ), a nor-binaltorfimina (antagonista seletivo de receptores κ) e o naltrindol (antagonista seletivo de receptores δ) não somente antagonizaram o efeito antinociceptivo da morfina (agonista não-seletivo de receptores opióides), como também reverteram o efeito antinociceptivo induzido pelo TTHL. A partir destes resultados, sugere-se que o TTHL pode causar antinociceção por promover a liberação de opióides endógenos, os quais irão interagir com seus receptores específicos; ou por interagir diretamente com receptores opióides. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para melhor evidenciar este fato.

Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas dentro do SNC se originam de uma série de núcleos localizados na linha média do tronco encefálico, denominados de núcleos da rafe. Estes núcleos representam vasta fonte de serotonina neuronal sintetizada no encéfalo de

mamíferos (FIELDS et al., 1991). O núcleo magno da rafe (NMR) é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante em modular o controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM, FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). O sistema serotoninérgico rafe-espinhal se projeta do bulbo ventromedial rostral, incluindo o NMR, para o corno dorsal da medula espinhal por meio do funículo dorsolateral e de fibras não-mielinizadas, modulando sensações dolorosas (OLESON et al., 1978; AZAMI et al., 1982; BRODIE, PROUDFIT, 1984; LIGHT et al., 1986; BASBAUM et al., 1988; MILLAN, 2002). Entretanto, o papel exercido pela 5-HT nos mecanismos de processamento nociceptivo na medula espinhal é controverso. Estudos de auto-radiografia revelaram a existência de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT₃ na medula espinhal. Também foi demonstrado que a ativação de alguns subtipos de receptores serotoninérgicos, como 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃, produzem antinocicepção (BARDIN et al., 2000; MILLAN, 2002). Os resultados apresentados na presente pesquisa sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do TTHL, uma vez que a depleção de serotonina endógena com PCPA (inibidor da enzima triptofano hidroxilase) aboliu o efeito antinociceptivo promovido pelo TTHL, nas mesmas condições que reverteu a antinocicepção causada pela morfina. Além disso, o pré-tratamento dos camundongos com antagonistas seletivos de receptores 5-HT_{1A} WAY 100635 e 5-HT_{2A/2C} cetanserina, mas não com antagonista 5-HT₃ ondansetrona, reverteram significativamente a antinocicepção causada pelo TTHL administrado via oral.

Dados da literatura demonstram a possível interação entre os sistemas opioidérgico e serotoninérgico. Há evidências de que neurônios serotoninérgicos estão envolvidos na antinocicepção causada por agonistas opióides. Desta forma, foi demonstrado que a injeção de morfina na substância cinzenta periaquedutal (PAG) promove aumento na liberação de serotonina (5-HT) na medula espinhal de ratos e que significativa proporção de neurônios serotoninérgicos que se projetam para a medula espinhal expressam receptores μ e δ -opióides (HAUBRICH et al., 1984; HAMON et al., 1991; FÜRST, 1999). Além disso, tem sido descrito que a depleção de 5-HT em nível espinhal por meio da utilização de neurotoxina 5,7-diidroxitriptamina atenua os efeitos antinociceptivos da morfina (VASKO et al., 1984). Evidenciou-se também que a destruição seletiva de neurônios serotoninérgicos do NMR reduz significativamente a antinocicepção causada pela morfina (MOHRLAND, GEBHART, 1980). Estes dados sugerem que a analgesia causada por opióides pode ser mediada, em parte, pela ativação de neurônios serotoninérgicos do NMR culminando na síntese espinhal de 5-HT (DICKENSON et al., 1981; GUIRIMAND et al., 1995).

Uma vez que, os sistemas opioide e serotoninérgico estão envolvidos no efeito antinociceptivo do TTHL; e que a sinalização intracelular promovida pela ativação dos receptores opióides e serotoninérgicos, são acoplados à proteína G_i e, entre outros efeitos, promovem a abertura de canais de potássio; levantou-se a hipótese de que a proteína G_i bem como os canais de potássio participa do efeito antinociceptivo do TTHL.

Assim, observou-se no presente estudo que a inativação da proteína G_i , por meio do tratamento dos animais com toxina pertussis, além de reverter o efeito antinociceptivo da morfina, reverteu a antinocicepção causada pelo TTHL. A toxina pertussis inativa a G_i por ribosilação da sua subunidade catalítica (subunidade α) (WEN et al., 2003) e a inativação desta proteína contribui para a ativação de receptores excitatórios, como o receptor NMDA (AGHAJANIAN, WANG, 1986; JEONG et al., 2001).

Os resultados apresentados neste trabalho também demonstraram que a ativação dos canais de potássio dependentes de ATP, e dos canais de K^+ dependentes de voltagem e de alta condutância ativados por cálcio, mas não aqueles canais K^+ de baixa condutância ativados por cálcio, estão envolvidos na antinocicepção causada pelo TTHL. Isto porque o pré-tratamento dos animais com glibenclamida, caribdotoxina ou TEA reverteu o efeito antinociceptivo causado pelo TTHL no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. Entretanto, a apamina, bloqueador de canais de K^+ de baixa condutância ativados por cálcio, não preveniu a ação antinociceptiva do TTHL. Estes dados estão de acordo com a hipótese anteriormente formulada de que a antinocicepção promovida pelo TTHL depende da interação com a proteína G_i e a abertura de canais de K^+ . Há dados na literatura que evidenciam que a ativação da proteína G_i além de inibir a atividade da AC promove a abertura de dois diferentes tipos de canais de potássio retificadores de corrente: canais de potássio dependentes de ATP e os canais de potássio com retificação em influxo regulados por proteína G (GIRK) (CHILDERS, DEADWYLER, 1996; OCAÑA et al., 2004).

Adicionalmente, o TTHL administrado por outras vias que não a oral, como periféricamente via intraplantar ou centralmente via intratecal, inibiu de maneira significativa a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (dados do presente trabalho e LONGHI-BALBINOT et al., 2009). Levando em consideração que o TTHL exerce efeito antinociceptivo tanto administrado sistemicamente ou centralmente sobre a nocicepção induzida pela injeção intradérmica de glutamato, sugere-se que este efeito decorra da interação com neurônios glutamatérgicos presentes na medula espinhal.

Desta forma, postulou-se a hipótese de que o TTHL age sobre o sistema glutamatérgico, reduzindo a transmissão nociceptiva glutamatérgica em nível espinhal. Neste

sentido, foi demonstrado no presente estudo que a injeção intratecal (i.t.) de TTHL foi capaz de inibir de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato. Como mencionado anteriormente, o glutamato é encontrado primariamente em fibras sensoriais do tipo C e estão envolvidos na transmissão da informação nociceptiva da periferia até regiões supra-espinhais (BEIRITH et al., 2002; BEIRITH et al., 2003). Os receptores para o glutamato (GluRs) são os responsáveis por mediar a maior parte da neurotransmissão excitatória no SNC de mamíferos. GluRs estão divididos em duas classes principais, receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos (iGluRs) incluem canais iônicos permeáveis a cátions e são subdivididos em três grupos: AMPA, cainato e NMDA (NAKANISHI et al., 1992; OZAWA et al., 1998). Já, os receptores metabotrópicos (mGluRs) são acoplados a proteína G e modulam a ativação de segundos mensageiros, principalmente o 1,4,5 fosfato de inositol (IP₃), diacilglicerol (DAG) ou alteram a atividade de canais iônicos através da interação das subunidades intracelulares da proteína G (HUDSPITH, 1997; OZAWA et al., 1998; para revisão ver BLEAKMAN et al., 2006). A classificação é baseada na homologia entre as sequências de aminoácidos, farmacologia e a qual sistema efetor intracelular o receptor está acoplado. São descritos até o presente momento oito tipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs1-8). Esses receptores foram classificados em grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8) (CONN, PIN, 1997; para revisão ver BLEAKMAN et al., 2006).

Neste estudo foi demonstrado que a injeção i.t. de 65,5 nmol/sítio de TTHL, dose esta que reduz significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.t. de glutamato, reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de agonistas de receptor ionotrópico e metabotrópico, NMDA e trans-ACPD. Entretanto, o TTHL não inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de AMPA e cainato. Dessa forma, estes resultados corroboram a hipótese anteriormente formulada, de que o sistema glutamatérgico espinhal está envolvido no efeito antinociceptivo central do TTHL, possivelmente por meio da interação com receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA) e metabotrópicos (Figura 23).

Com base nos resultados obtidos, a nossa próxima pergunta foi: Será que o TTHL possui efeito similar aos antagonistas de receptores NMDA e metabotrópico em inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD? Para responder a esta questão antagonistas de receptores NMDA, MK-801 e metabotrópico, (RS)-MCPG foram injetados i.t., e posteriormente os animais receberam injeção i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD. Foi demonstrado que o MK-801, em dose que reduz $77 \pm 11\%$ o

comportamento nociceptivo induzido pelo NMDA, reduziu parcialmente ($37 \pm 9\%$) a resposta nociceptiva induzida pelo trans-ACPD, agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Além disso, demonstrou-se que o (RS)-MCPG não foi capaz de inibir significativamente a nocicepção induzida pelo NMDA. Entretanto, este antagonista inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t de trans-ACPD em camundongos.

É importante salientar que no presente estudo o TTHL foi efetivo em inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA e trans-ACPD tanto quanto o MK-801. Adicionalmente, o antagonista do receptor metabotrópico (RS)-MCPG não alterou a nocicepção induzida pelo NMDA, mas o antagonista de receptores NMDA, MK-801 atenuou a nocicepção induzida pelo trans-ACPD, o que sugere interação entre receptores NMDA e metabotrópicos em induzir nocicepção. Estes resultados fortalecem a hipótese levantada anteriormente que o TTHL possui efeito semelhante aos antagonistas de receptores NMDA (ionotrópico) e metabotrópico em inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de glutamato, NMDA e trans-ACPD.

Dados da literatura têm demonstrado interação sinérgica pós-sináptica entre receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópico em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (BLEAKMANN et al., 1992; CERNE, RANDIC, 1992; BOND, LODGE, 1995; JONES, HEADLEY, 1995; ZHONG et al., 2000). De acordo com esses dados, foi verificado por vários pesquisadores que os receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I (mGluR1 e 5) localizados na medula espinhal potencializam as respostas ao NMDA e estão envolvidos na transmissão nociceptiva (NEUGBAUER et al., 1994; FISHER, CODERRE, 1996; FUNDYTUS et al., 2001; ZANCHET et al., 2004). Além disso, os mGluRs 1 e 5 da medula espinhal contribuem para a regulação da neurotransmissão mediada pelos aminoácidos excitatórios em neurônios aferentes primários. Assim, quando ativados, promovem a liberação de glutamato e conseqüente aumento na atividade de receptores NMDA no corno dorsal da medula espinhal (CERNE, RANDIC, 1992; NEUGBAUER et al., 1994; URBAN et al., 1994; UGOLINI et al., 1997; SEVOSTIANOVA, DANYSZ, 2006).

Evidências sugerem que a ativação dos mGluRs 1 e 5 estimulam a fosfolipase C β , por meio da proteína Gq/11, convertendo o fosfatidil-inositol bifosfato (PIP₂) em DAG e IP₃. O DAG, por sua vez, ativa isoformas de proteína quinase C (PKC) - dependentes e independentes de Ca²⁺ os quais podem fosforilar sítios de serina/treonina do receptor NMDA (SÁNCHEZ-PÉREZ, FELIPO, 2005). Assim, uma possível consequência funcional da ativação de receptores metabotrópicos do grupo I é sensibilizar os receptores NMDA e então promover a hiperexcitabilidade neuronal (GUO et al., 2004; GABRA et al., 2007).

Frente às evidências supracitadas e aos resultados encontrados no presente estudo, perguntou-se qual o possível envolvimento de receptores NMDA e metabotrópicos (ou a interação entre eles) no efeito antinociceptivo do TTHL. Para responder esta questão, doses subativas de (RS)-MCPG e TTHL ou MK-801 e TTHL foram associadas (administradas i.t.) e avaliadas na nocicepção induzida pela injeção i.t de NMDA e trans-ACPD. E a partir deste esquema de tratamento foi observado que a associação de dose subativas de (RS)-MCPG e TTHL ou MK-801 e TTHL promoveu efeito antinociceptivo sinérgico sobre a nocicepção induzida pelo trans-ACPD e NMDA, respectivamente. Ao contrário, doses subativas de (RS)-MCPG e TTHL ou MK-801 e TTHL não afetaram a resposta nociceptiva induzida pelo NMDA e trans-ACPD, respectivamente. Juntos, esses dados sugerem que o efeito antinociceptivo do TTHL pode estar relacionado à interação com vias intracelulares glutamatérgicas em comum como PKC, aumento intracelular de Ca^{2+} , MAPKs (ERK) (MELLER et al., 1996; YANG et al., 2004; WEI et al., 2006) ou ainda devido a interação direta com receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópico.

Para comprovar a hipótese de que a ação promovida pelo TTHL poderia envolver os receptores glutamatérgicos, foram realizados experimentos de ligação específica com [3H]-L-glutamato em membranas de encéfalo de camundongos. Pode-se observar a partir dos resultados que a ligação do glutamato, tanto na ausência quanto na presença de Na^+ , é reduzida pelo TTHL. Isto sugere que o TTHL interage diretamente com receptores de glutamato bem como, com sítios de ligação em sistemas de transporte deste aminoácido excitatório, uma vez que os experimentos realizados em meio contendo ou não Na^+ identificam a ligação do composto com transportadores de glutamato e sua interação com receptores glutamatérgicos, respectivamente. Adicionalmente, o efeito do TTHL em deslocar o glutamato tanto de seus receptores quanto do sítio de ligação no transportador não se deve à ação inespecífica deste composto, uma vez que, quando testado nas mesmas concentrações em outro modelo, a fim de verificar *in vitro* a atividade da enzima monoamina oxidase-A (MAO-A), o TTHL não inibiu a atividade desta enzima (Apêndice; figura 24).

A concentração de glutamato na fenda sináptica determina a extensão da estimulação do receptor e da transmissão sináptica excitatória. A remoção do glutamato da fenda sináptica é principalmente dependente de Na^+ e transportadores de glutamato neuronal. Atualmente cinco isoformas de transportadores de glutamato foram identificados: transportador de glutamato/aspartato, GLAST-1; transportador de glutamato 1, GLT-1; carreador de aminoácido excitatório, EAAC; transportador de aminoácido excitatório 4 e 5, EAAT-4 e EAAT-5. Os homólogos humanos dos três principais transportadores de glutamato (GLAST,

GLT-1 e EAAC-1) são denominados de transportadores de glutamato, EAAT1, EAAT2, EAAT3, respectivamente (DANBOLT, 2001). Estudos têm demonstrado a expressão de transportadores de glutamato, GLAST, GLT-1 e EAAC-1, no corno dorsal da medula espinhal de ratos e camundongos. GLT-1 e GLAST estão distribuídos em células gliais na camada superficial do corno dorsal da medula espinhal. Enquanto que o EAAC-1, além da medula espinhal, também se encontra expresso em neurônios do GRD (TAO et al., 2004). A expressão e o padrão de distribuição dos transportadores de glutamato, neuronal e glial, na superfície do corno dorsal da medula espinhal sugerem que estes contribuem significativamente para o transporte de glutamato e assim para a transmissão nociceptiva em nível espinhal (TAO et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que a inibição do transportador espinhal de glutamato induz efeitos pró-nociceptivos em condições normais. Liaw et al. (2005) mostraram que a injeção i.t. de bloqueadores do transportador de glutamato como o DL-threo- β -benziloxiaspartato (TBOA) e o diidrocainato (DHK) produziram respostas nociceptivas significantes e dependente da dose, de modo semelhante às respostas nociceptivas induzidas pela injeção i.t. de agonistas dos receptores glutamatérgicos, como o glutamato, NMDA e AMPA (AANONSEN, WILCOX, 1987; BRAMBILLA et al., 1996; KONTINEN, MEERT, 2002). Além disso, verificou-se que as respostas nociceptivas induzidas pelo TBOA são inibidas significativamente pela injeção i.t. de MK-801, AP-5 (antagonistas do receptor NMDA) e de CNQX (antagonista de receptores não-NMDA) (LIAW et al., 2005). Esses dados indicam que a reduzida remoção do glutamato da fenda sináptica em nível espinhal acarreta em acúmulo excessivo de glutamato que, por sua vez, resulta em superativação dos receptores de glutamato o que promoverá indução de respostas nociceptivas espontâneas e hiperexcitabilidade sensorial (TAO et al., 2005).

Por outro lado, tem sido demonstrado que em estados patológicos de dor a inibição do transportador de glutamato produz efeitos antinociceptivos. Por exemplo, a hiperalgesia induzida pelas prostaglandinas E e F_{2 α} (PGE₂ e PGF_{2 α}) e NMDA são atenuadas por inibidores do transportador de glutamato (MINAMI et al., 2001). Niederberger et al. (2003) verificaram que a inibição ou a supressão transitória do GLT-1 na medula espinhal de ratos resulta em significativa redução da resposta nociceptiva induzida pela formalina. Adicionalmente, Tao et al. (2003) demonstraram que três diferentes inibidores do transportador de glutamato (TBOA, DHK e threo-3-hidroxiaspartato) reduzem a resposta nociceptiva induzida pela formalina bem como a hiperalgesia térmica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos.

É importante salientar que ainda necessita ser esclarecido como e porque inibidores do transportador de glutamato promovem efeitos antinociceptivos em condições patológicas que se opõem aos seus efeitos pró-nociceptivos em condições normais. No entanto, vários mecanismos podem contribuir para os efeitos antinociceptivos dos inibidores do transportador de glutamato sob condições patológicas. Um dos mecanismos seria que, sob condições patológicas, a antinocicepção causada por inibidores do transportador de glutamato poderia ser devida a redução na liberação pré-sináptica de glutamato via ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos inibitórios nos aferentes primários e/ou via dessensibilização de receptores glutamatérgicos em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (MAKI et al., 1994; SCANZIANI et al., 1997; DUBE, MARSHALL, 2000; TAO et al., 2005).

Outra possibilidade, e a mais aceita no meio científico, reside no fato de que em condições patológicas, a exemplo do que ocorre na isquemia cerebral, há um distúrbio no metabolismo energético (redução de ATP), resultando na inversão da operação realizada pelo transportador de glutamato espinhal e consequente liberação de glutamato. Então, é possível que o bloqueio da liberação de glutamato causado pela inibição do transporte reverso deste aminoácido excitatório resulte na antinocicepção observada após a administração de inibidores do transportador de glutamato (SCHADRAK et al., 1999; PHILLIS et al., 2000; DANBOLT, 2001; VIKMAN et al., 2003; TAO et al., 2005). Assim sendo, sugere-se que o TTHL exerce seu efeito antinociceptivo por inibir o transporte de glutamato e/ou interagir diretamente com os receptores glutamatérgicos, NMDA e/ou metabotrópicos, antagonizando os efeitos pró-nociceptivos decorrentes da ativação destes receptores (Figura 23).

Interações entre os receptores NMDA e opióides e entre receptores NMDA e serotoninérgicos, têm sido demonstradas no SNC (MAO, 1999); interações estas que contribuem para a inibição da transmissão nociceptiva. Em relação ao sistema opióide, têm sido observadas interações antinociceptivas sinérgicas entre agonistas opióides e antagonistas de receptores NMDA em vários modelos de dor (NISHIYAMA et al., 1998; BOSSARD et al., 2002; MANSIKKA et al., 2002; SNIJDELAAR et al., 2005; YOSHIKAWA et al., 2007; ZHANG et al., 2009). Parece que esta interação se deve à associação do efeito dos agonistas opióides, agindo pré-sinápticamente nos terminais das fibras C, e antagonistas de receptores NMDA agindo na pós-sinapse, no neurônio de segunda ordem, promovendo redução na liberação de neurotransmissores. Outra hipótese é que antagonistas de receptores NMDA, por impedirem a ativação da proteína quinase C (PKC) (mediada pela ativação destes receptores) e a consequente dessensibilização de receptores opióides, podem restabelecer ou ainda aumentar o efeito dos opióides em inibir a resposta nociceptiva (MESTEK et al., 1995;

ALEY, LEVINE, 1997; ZHANG et al., 2009). Em se tratando da interação entre receptores NMDA e serotoninérgicos, há dados na literatura demonstrando que antagonistas de receptores NMDA promovem a ativação da enzima triptofano hidroxilase e conseqüentemente aumento na liberação de serotonina (JOHNSON et al., 1989; TAO, AUERBACH, 1996; CALLADO et al., 2000; SMITH, WHITTON, 2000; SEGIETH et al., 2001).

Baseado nestes fatos e nos resultados obtidos no presente estudo avanta-se a hipótese de que o TTHL pode ocasionar a liberação central de opióides endógenos e que por modular negativamente o sistema glutamatérgico, principalmente via receptores NMDA promove (1) aumento do efeito antinociceptivo dos opióides endógenos; e/ou (2) aumento na liberação de serotonina, a qual por meio da interação com receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂ inibe a transmissão nociceptiva.

No que diz respeito à substância P, vários estudos mostram que a injeção i.t. desse peptídeo ativa receptores para neurocinina 1 (NK1) e desencadeia a liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal. Desta forma, transmite o sinal nociceptivo para áreas supra-espinhais do sistema nervoso central (BATTAGLIA, RUSTIONI, 1988; BIASI, RUSTIONI, 1988; MILLAN, 1999; LIMA-JÚNIOR et al., 2007). Assim, hipotetizou-se que a substância P poderia estar envolvida no efeito antinociceptivo do TTHL, visto sua interação com o sistema glutamatérgico. No presente estudo, observou-se que a co-administração de TTHL inibiu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de substância P. Esses resultados, junto com os dados da inibição da nocicepção induzida pelo NMDA e trans-ACPD, reforçam a inibição da transmissão glutamatérgica pelo TTHL.

Evidências na literatura demonstram que a modulação de receptores glutamatérgicos, em várias espécies de mamíferos incluindo humanos, promove efeito antinociceptivo (LUFTY et al., 1997; WIECH et al., 2004). Sendo assim, moduladores de receptores glutamatérgicos apresentam potencial atividade terapêutica para o tratamento da dor. Contudo, o emprego na clínica destas substâncias como analgésicos é limitado devido aos efeitos indesejáveis que elas promovem (MILLAN, 1999). Tem sido demonstrado que várias substâncias que antagonizam os receptores NMDA (PARSONS, 2001) ou receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I (TAKAHASHI, AFFORD, 2002; PIETRASZECK et al., 2007) produzem alterações significativas na atividade locomotora. Embora o efeito do TTHL pareça depender da modulação negativa de receptores glutamatérgicos (NMDA e metabotrópico), é importante salientar que os resultados obtidos no presente estudo

demonstraram que a antinocicepção causada pelo TTHL não está associada a efeitos inespecíficos como alterações na atividade locomotora dos camundongos.

Tem sido demonstrado que o glutamato e a SP são capazes de ativar células gliais promovendo a subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β (para revisão ver WIESELER-FRANK et al., 2004). Além disso, a capacidade das citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β , em induzir respostas nociceptivas quando administradas intratecalmente, tem sido atribuída a liberação de glutamato e SP de terminais aferentes primários (TADANO et al., 1999; CHOI et al., 2003). Evidências demonstram que a liberação de TNF- α e IL-1 β por astrócitos (que são as células gliais mais abundantes no SNC) aumentam a excitabilidade neuronal e a força sináptica por aumentar a condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, bem como por aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN, MALENKA, 2006). Em adição, verificou-se que a IL-1 β aumenta o influxo de íons Ca²⁺ por meio de receptores NMDA em neurônios da medula espinhal (VIVIANI et al., 2003). Recentemente, Zhang et al. (2008) demonstraram que a IL-1 β promove fosforilação da subunidade NR-1 do receptor NMDA, causando assim a sua ativação. Baseado nestes achados, o próximo passo do presente estudo foi avaliar se o TNF- α e a IL-1 β estão envolvidos no efeito antinociceptivo do TTHL. De fato, foi verificado que o TTHL, administrado v.o e i.t., promoveu significativa inibição das respostas nociceptivas induzidas pela injeção i.t. de TNF- α e IL-1 β . Desta forma, a partir destes resultados pode-se sugerir que o TTHL exerce seu efeito antinociceptivo tanto por impedir a liberação de glutamato e SP pelas citocinas pró-inflamatórias ou por inibir a ativação de neurônios de projeção pelo glutamato, via inibição dos receptores NMDA.

Alguns estudos têm demonstrado importante envolvimento de receptores glutamatérgicos, principalmente receptores NMDA em processos de dor neuropática (MAO et al., 1992; DICKENSON et al., 1997; YOSHIMURA, YONEHARA, 2006). Além disso, estudos recentes demonstraram que as células gliais, como astrócitos e microglias, participam ativamente dos processos nociceptivos crônicos por apresentarem vários receptores relevantes e sintetizarem vários mediadores importantes na transmissão da dor, os quais podem modular a função sináptica e a excitabilidade neuronal por diferentes mecanismos (HAYDON, 2001; GUO, SCHLUSENER, 2007; HALASSA et al., 2007; POCOCK, KETTENMANN, 2007; MILLIGAN et al., 2009). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC. A proximidade destas células com os neurônios permite a ativação astrocitária por diversos neurotransmissores, além disso, os astrócitos expressam vários receptores de membrana

(PORTER, McCARTHY, 1997). Entre estes se destacam os receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não-NMDA, bem como receptores purinérgicos e receptores para a SP. Durante condições neuropáticas, os astrócitos permanecem ativados em resposta aos mediadores pró-inflamatórios derivados das microglias ativadas inicialmente (JI, SUTER, 2007). Geralmente as microglias atuam como a primeira linha de defesa contra invasão de algum patógeno, reconhecendo, sequestrando e processando antígenos. Entretanto, as microglias (tanto perivascular como as residentes) expressam diversos neurotransmissores que também são encontrados em astrócitos e neurônios (POCOK, KETTENMANN, 2007). Assim, a ativação de células microgliais produz liberação de diversas substâncias, como por exemplo, glutamato, TNF- α , IL-1 β e IL-6, e subsequente ativação de astrócitos e neurônios vizinhos envolvidos no início e manutenção da dor neuropática (WATKINS, MILLIGAN, 2001; MARCHAND et al., 2005; McMAHON et al., 2005; MILLIGAN, WATKINS, 2009). Tem sido demonstrado que a dor crônica difere da dor aguda não somente no que se refere ao tempo de persistência, mas também em relação às mudanças adaptativas, tais como neuroplasticidade, a qual tem sido descrita em vários níveis do sistema nervoso (BESSON, 1999). A dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda de funcionalidade e da qualidade de vida. Apesar dos avanços nas diversas áreas de conhecimento relacionadas à dor, como epidemiologia, fisiopatologia e terapêutica, os resultados dos tratamentos como prevenção das recorrências ainda não são satisfatórios (YENG, TEIXEIRA, 2004). Sabe-se que a dor crônica é causada por múltiplos fatores, incluindo lesão de nervos. Uma das hipóteses da transmissão da dor prévia a lesão neuronal é a ativação espontânea e persistente de neurônios lesionados do GRD. Esta ativação promove a liberação de mediadores nociceptivos e citocinas pró-inflamatórias, as quais sensibilizam neurônios não lesados que participam do processo de perpetuação da dor (CUI et al., 2000). A sensibilização das fibras neuronais aferentes primárias por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , ou ainda pelo glutamato após lesão neuronal periférica parece ser mediada por cascata de sinalização complexa que envolve a produção de inúmeros outros mediadores como NO, bradicinina e PGE₂ (SOMMER, KRESS, 2004).

O próximo passo do presente estudo foi então analisar o possível efeito antinociceptivo do TTHL no modelo de dor crônica neuropática causada pela constrição parcial do nervo ciático, tendo em vista que ela envolve tanto o sistema glutamatérgico como citocinas pró-inflamatórias (MAO, 1992; DICKENSON et al., 1997; CUI et al., 2000; YOSHIMURA, YONEHARA, 2006; POCOCK, KETTENMANN, 2007; MILLIGAN, WATKINS, 2009). De fato, os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento

sistêmico (v.o.) agudo ou prolongado dos camundongos com TTHL, reduziu significativamente a alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático. Este efeito foi evidente durante todo o tratamento. Contudo, quando o tratamento foi interrompido por dois dias, a alodinia mecânica foi restabelecida. Após esse intervalo, o tratamento dos animais com TTHL foi reiniciado e observou-se que o mesmo foi capaz de reduzir a alodinia mecânica de forma semelhante ao tratamento agudo, indicando que o TTHL parece não apresentar efeito cumulativo nem induzir tolerância.

Há evidências que demonstram que a ativação de receptores NMDA apresenta importante papel nos mecanismos envolvidos na reduzida eficácia de receptores opióides em estados crônicos de dor neuropática. Por exemplo, o efeito antinociceptivo da morfina é reduzido em ratos com lesão no nervo periférico na ausência do tratamento crônico (diário), sendo, porém, revertido após a administração de MK-801 (MAO et al., 1995). Então, levando em consideração a eficácia de antagonistas de receptores NMDA no tratamento da dor crônica, uma possível ação terapêutica benéfica poderia ser o uso combinado de antagonistas de receptores NMDA e opióides no tratamento da dor crônica. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que o TTHL, por inibir a ativação de receptores NMDA, inibe o desenvolvimento de tolerância induzida pelos analgésicos opióides. Portanto, por terem seu efeito antinociceptivo potencializado são eficazes no tratamento da dor crônica neuropática.

Desta forma, em conjunto os resultados do presente trabalho sugerem que o TTHL exerce seu efeito antinociceptivo, tanto em modelos de dor aguda quanto crônica, por antagonizar o efeito excitatório induzido pelo sistema glutamatérgico, principalmente inibindo a ativação de receptores NMDA e metabotrópicos. Neste sentido, o TTHL e seus derivados podem se tornar moléculas úteis para o desenvolvimento de fármacos de interesse terapêutico para o tratamento de dor aguda e crônica, tendo em vista que a ativação do sistema glutamatérgico é preponderante nestas situações. Os prováveis sítios para a ação do TTHL são apresentados na figura 23.

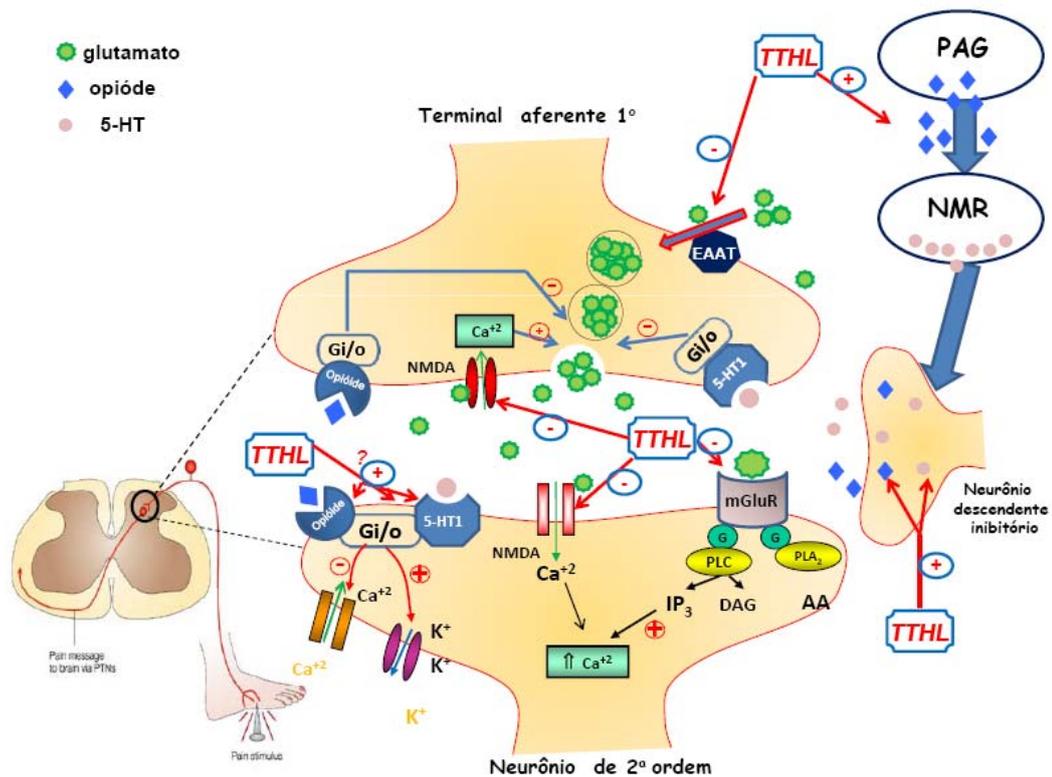


Figura 23 – Prováveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do TTHL. O presente estudo demonstra que o efeito antinociceptivo promovido pelo TTHL deve-se à: inibição de receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópico (mGluR); inibição do transportador de glutamato (EAAT), liberação de opióides endógenos (PAG-substância cinzenta periquedutal) os quais ativam neurônios serotoninérgicos do núcleo magno da rafe (NMR) e estimulam a síntese de 5-HT na medula espinhal. O TTHL também pode promover a liberação de opióides endógenos e 5-HT por meio de neurônios descendentes inibitórios no corno dorsal da medula espinhal os quais podem ativar seus receptores específicos acoplados a proteína G inibitória (Gi), resultando em abertura de canais de K⁺ e inibição da transmissão nociceptiva. Ou ainda o TTHL por antagonizar os receptores NMDA, poderá: 1) promover a síntese de serotonina; 2) aumentar o efeito antinociceptivo dos opióides endógenos. Fonte: adaptado de WATKINS, MAIER, 2003; e autora.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que:

- A administração sistêmica (v.o.) de TTHL promoveu antinocicepção significativa no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético e na nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela formalina;
- O TTHL administrado sistemicamente (via oral e intraperitoneal), centralmente (via intratecal) e/ou periféricamente (via intraplantar) inibiu significativamente a nocicepção induzida pela injeção de glutamato;
- Quando o glutamato foi administrado em diferentes tempos após o tratamento com TTHL (v.o.), verificou-se que o triterpeno apresenta pico de resposta antinociceptiva de 1 h, resposta esta que perdurou até 6 h após sua administração;
- O efeito antinociceptivo do TTHL, administrado por via oral, parece envolver a ativação do sistema opioidérgico (por meio dos receptores μ , κ e δ) e serotoninérgico (via receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂), e consequente ativação da proteína Gi e abertura de canais de K⁺ dependente de ATP, dependente de voltagem e canais de K⁺ de alta condutância operados por Ca²⁺;
- O TTHL, co-administrado com o glutamato, NMDA e trans-ACPD, pela via intratecal, inibiu significativamente a resposta nociceptiva induzida por estes agonistas glutamatérgicos;
- O TTHL é capaz de deslocar o glutamato de seus receptores e de seus sítios de ligação nos transportadores, verificado no ensaio de ligação específica (“binding”) com [³H]-L-glutamato, tanto na ausência quanto presença de Na⁺ em membranas de encéfalo de camundongos;

- O triterpeno, administrado v.o. ou i.t., reduziu a resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de TNF- α e IL-1 β ;
- O TTHL administrado i.t. não altera significativamente a atividade locomotora de camundongos, verificado no teste de campo aberto (open field);
- O tratamento sistêmico (v.o.) agudo ou prolongado dos camundongos com TTHL reverteu significativamente a alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático;

Enfim, estes dados confirmam que o TTHL possui importante efeito antinociceptivo em vários modelos de dor aguda e crônica, sugerindo que o mesmo pode constituir-se numa molécula interessante para o desenvolvimento de fármaco terapêuticamente útil no controle da dor aguda e crônica. No entanto, estudos adicionais de toxicidade e clínicos são ainda necessários para confirmar a importância terapêutica desta molécula na clínica.

REFERÊNCIAS

AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 243, p.9-19. 1987.

AGHAJANIAN, G.K.; WANG, Y.Y. Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and alpha 2-agonists in locus coeruleus neurons. **Brain Research**. v. 371, p. 390-394. 1986.

AGRA, M.F., et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 383-95. 2007.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Dissociation of tolerance and dependence for opioid peripheral antinociception in rats. **Journal of Neuroscience**. v. 17, p. 3907-3912. 1997.

ALMEIDA, F.R.C., et al. Estudo dos efeitos ansiolítico e relaxante muscular de *Combretum leprosum* MART. & EICHER. In: **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia, S.P. v. 1, p. 191. 2003.

ANGEH, J.E., et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, p. 56-60. 2007.

ARONSON, J.K. Potassium channels in nervous tissue. **Biochemical Pharmacology**. v. 43, p. 11-14. 1992.

ATTAL, N., et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. **European Journal Neurology**. Apr 9. 2010.

AZAMI, J.; LLEWELYN, M. B.; ROBERT, M. H. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**. v. 12, n. 3, p. 229-246. 1982.

BACKHOUSE, N., et al. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 160-165. 2008.

BARDIN, L., et al. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. **European Journal of Pharmacology**. v. 421, n. 2, p. 109-114. 2001.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**. v. 86, p.11-18. 2000.

BASBAUM, A. I. et al. The fiber caliber of 5-HT immunoreactive axons in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the rat and cat. **Somatosensory Research**. v. 5, n. 3, p. 177-185. 1988.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**. v. 7, n. 1, p. 309-338. 1984.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **Journal Comparative Neurology**. v. 277, p. 302-312. 1988.

BEESON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v.353, p.1610-1615. 1999.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate in the mouse paw. **Brain Research**. v. 924, p. 219-228, 2002.

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

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiology Review**. v.67, n.1, p.67-186. 1987.

BHAVE, G., et al. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nature Neuroscience**. v. 4, p. 417-423. 2001.

BIASI, S.; RUSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial lamina of spinal cord. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 85, p. 7820-7824. 1988.

BLEAKMAN, D., et al. Metabotropic glutamate receptors potentiate ionotropic glutamate responses in the rat dorsal horn. **Molecular Pharmacology**. v. 42, p.192-196. 1992.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E.S. Glutamate receptors and pain. **Seminaries Cell Developmental Biology**. v. 17, p. 592-664. 2006.

BOND, A.; LODGE, D. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor-mediated enhancement of responses to excitatory and inhibitory amino acids on rat spinal neurones in vivo. **Neuropharmacology**. v. 34, p. 1015-1023. 1995.

BOTTICELLI, L.J.; COX, B.M.; GOLDSTEIN, A. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal cord and dorsal root ganglia. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 78, p. 7783-7786. 1981.

BOWSHER, D. Pain syndromes and their treatment. **Current Opinion in Neurology and Neurosurgery**. v.6, n.2, p.257-263. 1993.

BOXALL, S.J., et al. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport**. v. 9, p. 1201-1203. 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMBILLA, A. et al. Pharmacological characterization of AMPA-induced biting behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 305, p. 115-117. 1996.

BRODIE, M. S.; PROUDFIT, H. K. Hypoalgesia induced by the local injection of carbachol into the nucleus raphe magnus. **Brain Research**. v. 291, n. 2, p. 337-342. 1984.

BUDAI, D.; FIELDS, H.L. Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. **Journal of Neurophysiology**. v. 79, p. 677-687. 1998.

CAFFERTY, W. Basic Science-Peripheral mechanisms. In: HOLDCROF, A., JAGGAR, S. **Core topics in Pain**. Cambridge University Press. New York, USA. p. 7-16. 2005. ISSN: 13 978-0-511-13261-2.

CAIRNS, B.E.; SESSLE, B.J.; HU, J.W. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. **Journal of Neuroscience**. v. 18, p. 8056-8064. 1998.

CALIXTO, J.B., et al. A review of the plants of the genus phyllanthus: Their Chemistry, Pharmacology and therapeutic potential. **Medical Research Review**. v. 8, p. 225-228. 1998.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 179-189. 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 131-4. 2005.

CALLADO, L.F., et al. Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. **Neuroreport**. v. 11, p. 173-176. 2000.

CAMPANA, W.M. Schwann cells: Activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. **Brain Behavior Immunity**. v. 21, p. 522-527. 2007.

CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neuroscience Letter**. v. 197, p. 25-28. 1995.

CARLTON, S.M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 in the periphery. **Brain Research**. v. 2, n. 3, p. 29-38. 1998.

CATHELIN, G.; LE GUEN, S.; BESSON, J.M. Effects of opioid receptor antagonists on the effects of i.v. morphine on carrageenin evoked c-Fos expression in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. **Brain Research**. v. 824, p. 105-111. 1999.

CERNE, R.; RANDIC, M. Modulation of AMPA and NMDA responses in rat spinal dorsal horn neurons by trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid. **Neuroscience Letters**. v. 144, p. 180-184, 1992.

CHAPLAN, S.R., et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, p. 55-63. 1994.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**. v.353, p. 2233-2237. 1999.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M.; ARAÚJO, F.S. Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, p. 555-557. 2007.

CHEN, S.R.; PAN, H.L. Blocking mu opioid receptors in the spinal cord prevents the analgesic action by subsequent systemic opioids. **Brain Research**. v. 1081, p. 119-125. 2006.

CHEN, W., et al. Comparing analgesia and m-opioid receptor internalization produced by intrathecal enkephalin: requirement for peptidase inhibition. **Neuropharmacology**. v. 53, p. 664-667. 2007.

CHILDERS, S.R.; DEADWYLER, S.A. Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**. v. 52, p. 819-827. 1996.

CHIZH, B.A. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: review article. **Amino Acids**. v. 23, p. 169-176. 2002.

CHOI, S.S., et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sciences**. v. 73, p.471-485. 2003.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Journal of Pain Symptom Manage**. v.25, n.5, p.S4-S11. 2003.

COLLIER, H.O.J., et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v. 32, p. 295-310. 1968.

CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 37, p. 205-237, 1997.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**. v. 72, p. 359-371. 2005.

CUI, J.G., et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**. v. 88, p. 239-248. 2000.

CUNHA F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 521, p. 22-39. 2003.

Da SILVA, C. *Combretum leprosum* Mart. & Eicher (Combretaceae) – Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DALCIN, K.B., et al. Age and brain structural related effects of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids on glutamate binding to plasma membranes during rat brain development. **Cell Molecular Neurobiology**. v. 27, p. 805-818. 2007.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**. v. 65, n.1, p. 1-105. 2001.

DAVIDSON, E.M.; CARLTON, S.M. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. **Brain Research**. v. 785, p. 136-142. 1998.

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, A.J.; PERKINS, M.N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **British Journal of Pharmacology**. v.113, p. 63-68. 1994.

DELEO, J.A.; SORKIN, L.S.;WATKINS, L.R. **Immune and Glial Regulation of Pain**. Seattle, IASP Press. 2007.

DICKENSON, A.H., et al. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat with or without PCPA pretreatment. **Brain Research**. v. 216, p. 313-321. 1981.

DICKENSON, A.H.; CHAPMAN, V.; GREEN, G.M. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **General Pharmacology**. v. 28, p. 633-638.1997.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.20, p. 441-462. 1980.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S. N. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research Review**. v.46, n.2, p.131-45. 2004.

DUBE, G.R., MARSHALL, K.C. Activity-dependent activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors in locus coeruleus. **Journal of Neurophysiology**. v. 83, p. 1141-1149. 2000.

DWORKIN, R.H., et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**. v. 60, p. 1524–1534. 2003.

EMANUELLI, T.; ANTUNES, V.F.; SOUZA, D.O. Characterisation of L-[³H]glutamate binding to fresh and frozen crude plasma membranes isolated from cerebral cortex of adult rats. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 44, p. 1265-1272. 1998.

EVANS, D.M.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.11, p. 300-305. 1996.

FACUNDO, V.A., et al. Arjunolic Acid in the Ethanolic Extract of *Combretum leprosum* Root and its Use as a Potential Multi-Functional Phytomedicine and Drug for Neurodegenerative Disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 16, p. 1309-1312. 2005.

FACUNDO, V.A., et al. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**. v. 32, p. 411-415. 1993.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 55, p. 225-276. 1966.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. v. 98, 729–733. 2003.

FERNANDES, F.F.A., et al. Evaluation of antiofidic activity of *Combretum leprosum* Mart Fruit Extract. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto, S.P. p. 09.089, 2007.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**. v. 38, p. 835–842. 1999.

FERREIRA, S.H., et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. v. 334, p. 698-700. 1988.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**. v. 14, n. 1, p. 219-245. 1991.

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

FREITAS, C. S. **Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da *Baccharis illinita* DC (Asteraceae)**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FRÖDE, T.S. **Mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias no modelo da pleurisia induzida pela carragenina e alguns mediadores, em camundongos**. 2000. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 48, n. 2, p. 129-141. 1999.

FUNDYTUS, M.E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**. v. 15, p. 29-58. 2001.

FYHRQUIST, P. **Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* L., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae)**. Dissertação Acadêmica. Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.

GABRA, B.H., et al. Decrease in N-methyl-D-aspartic acid receptor-NR2B subunit levels by intrathecal short-hairpin RNA blocks group I metabotropic glutamate receptor-mediated hyperalgesia. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutic**. v. 322, p. 186-194. 2007.

GADOTTI, V.M., et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Research**. v. 1093, p.116-122. 2006.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neuroscience**. v. 14, p. 60-67. 1991.

GAZERANI, P. Effects of subcutaneous administration of glutamate on pain, sensitization and vasomotor responses in healthy men and women. **Pain**. v.124, p. 338-348. 2006.

GIBB, J.W.; JOHNSON, M.; HANSON, G.R. MK-801 attenuates the methamphetamine induced decreased in tryptophan hydroxylase activity. **NIDA Research Monograph**. v. 95, p. 511. 1989.

GILANI, A.H.; RAHMAN, A.U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p. 43-49. 2005

GOLENIOWSKI, M.E., et al. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, p. 324-341. 2006.

GUIRIMAND, F., et al. Effects of intravenous morphine and buprenorphine on a C-fiber reflex in the rat. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutic**. v. 273, p. 830-841. 1995.

GUO, L.H.; SCHLUESENER, H.J. The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: The role of Toll-like receptors. **Cell Molecular Life Science**. v. 64, p.1128–1136. 2007.

GUO, W., et al. Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**. v. 24, p. 9161-9173, 2004.

HALASSA, M.M.; FELLIN, T.; HATDON, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Molecular Medicine**. v. 13, p. 54-63. 2007.

HAMON, M. D., et al. The contribution of monoamines and their receptors to pain control. In: BASBAUM, A. I., BESSON, J., eds. **Towards a new pharmacotherapy of pain**. Chicester, UK: Wiley, p. 83-102. 1991.

HAUBRICH, D. R., et al. The role of endogenous nonendorphin substances in nociception. In: KUCHAR, M., PASTERNAK, G., eds. **Analgesics: Neurochemical behavioral and clinical perspectives**. New York: Raven Press, p. 195-234. 1984.

HAYDON, P.G. Glia: listening and talking to the synapse. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 2, p. 185-193. 2001.

HILL, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**. v.7, p. 282-292. 2001.

HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **British Journal of Anaesthesiology**. v. 78, p. 731-747. 1997.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, p. 69-73, 1985.

HYLDEN, K.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal Pharmacology**. v. 67, p. 313–316. 1980.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**. v. 69, p. 2911–2919. 2001.

IRVING, G.A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**. v. 64, p. S21–S27. 2005.

ITO, A., et al. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT_{1A}-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**. v. 20, p. 6302-6308. 2000.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**. v. 62, p. 263-280. 2008.

JEONG, S.W.; IKEDA, S.R. Differential regulation of G protein-gated inwardly rectifying K(+) channel kinetics by distinct domains of RGS8. **Journal of Physiology**. v. 535, p. 335-347. 2001.

JESSE, C.R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C.W. Spinal mechanisms of antinociceptive effect caused by oral administration of bis-selenide in mice. **Brain Research**. v. 1231, p. 25-33. 2008.

JI, R.R.; SUTER, M.R. p38 MAPK, microglial signalling and neuropathic pain. **Molecular Pain**. v. 3, p. 33-33. 2007.

JINSMAA, Y., et al. Potent in vivo antinociception and opioid receptor preference of the novel analogue [Dmt1]endomorphin-1. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 84, p. 252-258. 2006.

JOHNSON, M.; HANSON, G.R.; GIBB, J.W. Effect of MK-801 on the decrease in tryptophan hydroxylase induced by methamphetamine and its methylenedioxy analog. **European Journal of Pharmacology**. v. 165, p. 315-318. 1989.

JONES, M.W.; HEADLEY, P.M. Interactions between metabotropic and ionotropic glutamate receptor agonists in the rat spinal cord in vivo. **Neuropharmacology**. v. 34, p. 1025- 1031. 1995.

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

KASTER, M.P.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Research Bulletin**. v. 67, p. 53-61. 2005.

KIM, S.G., et al. The effect of antagonists selective for mu- and delta-opioid receptor subtypes on alcohol consumption in C57BL/6 mice. **Alcohol**. v. 22, p. 85-90. 2000.

KONTINEN, V.K.; MEERT, T.F. Vocalization responses after intrathecal administration of ionotropic glutamate receptor agonists in rats. **Anesthesia and Analgesia**. v. 95, p. 997-1001. 2002.

KOSTER, R.; ADERSON, M.; DEBEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation. Proceedings**. v. 18, p. 412. 1959.

KUMAR, B., et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 103-113. 2007.

LAO, L., et al. Noxious mechanical stimulation evokes the segmental release of opioid peptides that induce mu-opioid receptor internalization in the presence of peptidase inhibitors. **Brain Research**. v. 1197, p. 85-93. 2008.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, p. 597-652. 2001.

LIAW, W.J., et al. Spinal glutamate uptake is critical for maintaining normal sensory transmission in rat spinal cord. **Pain**. v. 115, p. 60-70. 2005.

LIGHT, A. R.; CASALE, E. J.; MENETREY, D. M. The effects of focal stimulation in nucleus raphe magnus and periaqueductal gray on intracellularly recorded neurons in spinal laminae I and II. **Journal of Neurophysiology**. v. 56, n. 3, p. 555-571. 1986.

LIMA-JÚNIOR, R.C., et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflammation Research**. v. 56, p. 487-494. 2007.

LIRA, S.R.D., et al. Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**. v. 40, p. 213-215. 2002.

LOESER, J.D, TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**. v. 137, p. 473-477. 2008.

LONGHI-BALBINOT, D.T., et al. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**. v. 623, 30-36. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J .A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, S.P. Instituto Plantarum, 2002. ISSN: 85-86714-18-6.

LUIZ, A.P., et al. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 355-363. 2007.

LUO, Z.D. Mechanistic Dissection of Pain. In: LUO Z.D. (ED). **Pain Research: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press Inc, 2004.

LUTFY, K., et al. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**. v. 70, p. 31-40. 1997.

MAIA, J.L., et al. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: possible mechanisms. **Pharmacological Research**. v. 54, p. 282-286. 2006.

MAKI, R., ROBINSON, M.B., DICHTER, M.A. The glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 14, p. 6754-6762. 1994.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain**. v.76, p. 215-222. 1998.

MANNION, R.J., et al. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. **Journal of Neuroscience**. v.16, p. 5189-5195. 1996.

MAO, J., et al. Intrathecal MK801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviours in rats with experimental peripheral mononeuropathy. **Brain Research**. v. 576, p. 254-262.1992.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 6, p. 521-530. 2005.

MARINHO, I.V., et al. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. In: **I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária**. João Pessoa, 2002.

MATSUMOTO, T., et al. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. **Clinical Biochemistry**. v. 18, n. 2, p. 126-129. 1985.

McGAW, L.J., et al. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 75, p. 45-50. 2001.

McMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**. 192: 444-462. 2005.

MEDEIROS, C.M., et al. Atividade analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) (06.032). In: **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia, S.P. v. 1. p. 134, 2003.

MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**. v. 71, p. 327-335. 1996.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**. v. 52, p. 127-136. 1993.

MENESES, A.D., et al. Atividade antiulcerogênica de *Combretum leprosum* Mart & Eicher. In: **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Águas de Lindóia, S.P. v. 1. p. 193, 2003.

MENSE, S. Anatomy of nociceptors. In: BASBAUM, A.I.; BUSHNELL, M.C. **Science of pain**. 1 ed. Elsevier. p. 11-38. 2009. ISSN: 978-012-374625-2.

MEOTTI, F.C., et al. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**. v. 567, p. 198-205. 2007.

MEOTTI, F.C., et al. Redox modulation at the peripheral site alters nociceptive transmission in vivo. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**. v. 36, p. 272-277. 2009.

MESTEK, A., et al. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. **Journal of Neuroscience**. v.15, p. 2396-2406. 1995.

MICHAEL, G. J., et al. TrkA immunoreactive neurones in the rat spinal cord. **Journal of Comparative Neurology**. v.385, n.3, p.441-455. 1997.

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

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

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Review Neuroscience**. v. 10, p. 23-35. 2009.

MINAMI, T., et al. Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. **Brain Research**. v. 895, p. 178-185. 2001.

MOHRLAND, J.S., GEBHART, G.F. Effect of selective destruction of serotonergic neurons in nucleus raphe magnus on morphine-induced antinociception. **Life Science**. v. 27, p. 2627-2632. 1980.

NAGY, J. I., HUNT, S. P. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. **Neuroscience**. v.7, n.1, p.89-97. 1982.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**. v. 258, p. 597-603. 1992.

NEUGEBAUER, V., et al. The involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors in the responsiveness of rat spinal neurons with input from the chronically inflamed ankle. **Neuroscience Letters**. v. 170, p. 237-240, 1994.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: WERMUTH, C.G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3 ed. Elsevier. p. 159-186. 2008. ISBN: 978-0-12-374194-3.

NIEDERBERGER, E., et al. Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1. **Neuroscience**. v. 116, p. 81-87. 2003.

NINKOVIC, M.; HUNT, S.P.; GLEAVE, J.R.W. Localization of opiate and histamine H1-receptor in the primate sensory ganglia and spinal cord. **Brain Research**. v. 241, p. 197-206. 1982.

NISHIYAMA, T.; YAKSH, T.L.; WEBER, E. Effects of intrathecal NMDA and non-NMDA antagonists on acute thermal nociception and their interaction with morphine. **Anesthesiology**. v.89, p.715-722. 1998.

NORDLIND, K.; JOHANSSON; O. LIDEN, S.; HÖKFELT, T. Glutamate- and aspartate-like immunoreactivities in human normal and inflamed skin. **Virchows Archiv. B. Cell Pathology Including Molecular Pathology**. v. 64, p. 75-82. 1993.

NORTON, S. The origins of pharmacology in the 16th century. **Mol. Interv.** v. 5, p. 144-149. 2005.

OCAÑA, M., et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**. v. 500, p. 203-219. 2004.

OJEWOLE, J.A. Cardiovascular effects of mollic acid glucoside, a 1alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R Br ex G Don (Combretaceae) leaf. **Cardiovascular Journal of Africa**. v. 19, p. 128-134. 2008a.

OJEWOLE, J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1 alpha-hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**. v. 22, p. 30-35. 2008b.

OKA, T., HORI, T. **Brain cytokines and pain**. Basel: Birkhauser Verlag. p.183-204. 1999.

OLESSON, T. D.; TWOMBLY, D. A.; LIEBENSKIND, J. C. Effects of pain attenuating brain stimulation and morphine on electrical activity in the raphe nuclei of the awake rat. **Pain**. v. 4, n. 3, p. 211-230. 1978.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Critical Review in Neurobiology**. v.5, n.3, p.265-311. 1990.

OSSIPOV, MH; PORRECA, F. Neuropathic Pain: Basic Mechanisms. In: BASBAUM, A.I.; BUSHNELL, M.C. **Science of pain**. 1 ed. Elsevier. p. 833. 2009. ISSN: 978-012-374625-2.

OZAWA, A.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**. v. 54, p. 581- 618. 1998.

PARSONS, C.G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 429, p. 71-78. 2001.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. 2003. Disponível em: <<http://www.danepatrie.com>>. Acesso em 26 de janeiro de 2008.

PHILLIPSON, J.D. New drugs from nature-it could be yew. **Phytotherapy Research**. v.13, p. 2-8, 1999.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**. v. 68, p. 2960-2972. 2007.

PHILLIS, J.W., REN, J., O'REGAN, M.H. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-TBOA. **Brain Research**. v. 868, p. 105-12. 2000.

PIETRASZEK, M., et al. The role of group I metabotropic glutamate receptors in schizophrenia. **Amino Acids**. v. 32, p. 173-178. 2007.

PIETROVSKI, E.F., et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-ene obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v. 83, p. 90-99. 2006.

POCOCK, J.M., KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neuroscience**. v.10, p. 23-35. 2007.

PORTER, J.T., MCCARTHY, K.D. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. **Progress in Neurobiology**. v. 51, p. 439-455. 1997

PRIESTELEY, J. V. Trophic Factors and Their Receptors in Pain Pathways. In: MALCANGIO, M. **Synaptic plasticity and Pain**. Nova Iorque, EUA. Springer. p. 21-49. 2009. ISBN: 978-1-4419-0226-9.

RANDIC, M.; HECIMOVIC, H.; RYU, P.D. Substance P modulates glutamate-induced currents in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurones. **Neuroscience Letters**. v. 117, p. 74-80. 1990.

REN, K., DUBNER, R. Descending Control Mechanisms. In: BASBAUM, A.I.; BUSHNELL, M.C. **Science of pain**. 1 ed. Elsevier. p. 724-749. 2009. ISBN: 978-012-374625-2.

RIBEIRO, R.A., et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 387, p. 111-118. 2000.

RIBEIRO-DA-SILVA, A., DE KONINCK, Y. Morphological and neurochemical organization of the spinal dorsal horn. In: BUSHNELL, M.C.; BASBAUM, A.I. **Pain**. Academic Press, San Diego. 2008.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**. v. 101, p. 43-49. 2008.

RODRIGUES, A.L., et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Science**. v. 70, p. 1347-1358. 2002.

ROSA, K.A., et al. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**. v. 381, p. 185-188. 2005.

ROTHSTEIN, J.D., et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**. v. 13, n. 3, p. 713-725. 1994.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review Medicine**. v.49, p.123-133. 1998.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**. v. 13, p. 161-171. 2008.

SAKURADA, T., et al. Differential effects of intraplantar capsaizepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v.75, p. 115-121. 2003.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; GARZÓN, J. Cholera toxin and pertussis toxin an opioid and α 2-mediated supraspinal analgesia in mice. **Life Science**. v. 48, p. 1721-1727. 1991.

SÁNCHEZ-PÉREZ, A.M.; FELIPO, V. Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. **Neurochemistry International**. v. 47, p. 84-91. 2005.

SANT' ANNA, G. S., et al. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 2, p. 546-549. 2009.

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**. v. 31, p. 381-389. 1997.

SANTOS, A.R.S., et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, p.417-426. 1999.

SANTOS, A.R.S., et al. The involvement of K⁺ channels and Gi protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **European Journal of Pharmacology**. v. 379, p. 7-17. 1999.

SANTOS, A.R.S., et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**. v.48, p.1021-1034. 2005.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacology Review**. v. 55, p. 1-20. 2003.

SCANZIANI, M., et al. Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. **Nature**. v. 385, p. 630-634. 1997.

SCHADRACK, J., et al. Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. **Neuroscience**. v. 94, p. 595-605. 1999.

SCHEIDT, C., et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**. v. 43, p.340-347. 2002.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells, and glia. **Nature Neuroscience**. v. 10, p. 1361–1368. 2007.

SEGIETH, J., et al. Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. **Naunyn-Schmiedeberg's Archive Pharmacology**. v. 363, p. 302-306.2001.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. **Pain**. v. 43, p. 205-218. 1990.

SEVOSTIANOVA, N.; DANYSZ, W. Analgesic effects of mGlu1 and mGlu5 receptor antagonists in the rat formalin test. **Neuropharmacology**. v. 51, p. 623-630. 2006.

SILVERMAN, J. D.; KRUGER, L. Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. **Journal of Neurocytology**. v.19, n.5, p.789-801. 1990.

SMITH, J.C.E.; WHITTON, P.S. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. **Neuroscience Letters**. v. 291, p. 5-8. 2000.

SNIJDELAAR, D.G., et al. Effects of pre-treatment with amantadine on morphine induced antinociception during second phase formalin responses in rats. **Pain**. v. 119, p.159-167. 2005.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**. v. 361, p. 184-187. 2004.

SOUZA, D.O.; RAMIREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 3, p. 39-45. 1991.

STÄNDER, S., et al. Localization of μ -opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. **Regulatory Peptides**. v.110, p. 75-83. 2002.

STEIN, C., et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v.87, p.5935-5939. 1990.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . **Nature**. v. 440, p. 1054-1059. 2006.

STRONG, P.N. Potassium channel toxins. **Pharmacology and Therapeutics**. v.46, p.137-162. 1990.

STUCKY, C. L.; LEWIN, G. R. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. **Journal of Neuroscience**. v.19, n.15, p.6497-6505. 1999.

TADANO, T., et al. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Science**. v. 65, p. 255–261. 1999.

TAKAHASHI, M.; AFFORD, S. The requirement of presynaptic metabotropic glutamate receptors for the maintenance of locomotion. **Journal of Neuroscience**. v. 22, p. 3692-3699. 2002.

TAKEMORI, A.E.; PORTOGHESE, P.S. Enkephalin antinociception in mice is mediated by delta1- and delta 2-opioid receptors in the brain and spinal cord, respectively. **European Journal of Pharmacology**. v. 242, p. 145-150. 1993.

TAO, F., et al. Evidence of neuronal excitatory amino acid carrier 1 expression in rat dorsal root ganglion neurons and their central terminals. **Neuroscience**. v. 123, n. 4, p. 1045-1051. 2004.

TAO, R.; AUERBACH, S.B. Differential effect of NMDA on extracellular serotonin in rat midbrain raphe and forebrain sites. **Journal of Neurochemistry**. v. 66, p. 1067-1075. 1996.

TAO, Y-X., et al. Evidence for the involvement of spinal cord glutamate transporters in the development of chronic inflammatory pain. In: **ASA 2003 Annual Meeting**. San Francisco, CA, EUA . p. 12–16, 2003.

TAO, Y.X.; GU, J.; STEPHENS, R.L. Role of spinal cord glutamate transporter during normal sensory transmission and pathological pain states. **Molecular Pain**. v. 21, p. 1-30. 2005.

TJØLSEN, A., et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, p. 5-17. 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.M. (Eds.), **The pharmacology of pain**, 130/I. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-20. 1997.

TODD, A.J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHON, S., KOLTZENBURG, M. **Melzack and Wall's textbook of pain**, Churchill Livingstone, Edinburgh. 2005.

TODD, A.J. Changes in NK1 and Glutamate Receptors in Pain. In: MALCANGIO, M. **Synaptic plasticity and Pain**. Nova Iorque, EUA. Springer. p. 7-20. 2009. ISBN: 978-1-4419-0226-9

UGOLINI, A.; CORSI, M.; BORDI, F. Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. **Neuropharmacology**. v.36, p. 1047-1055. 1997.

URBAN, L.; THOMPSON, S.W.; DRAY, A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. **Trends in Neuroscience**. v.7, p. 432-438. 1994.

URCA, G.; RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord. **European Journal Pharmacology**. v.153, p.211-220. 1988.

VANDERAH, T. W., et al. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **J Neurosci**, v.20, n.18, p.7074-7079. 2000.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of Pain. **Medical Clinics of North America**. v. 91, p. 1-12. 2007.

VASKO, M.R.; PANG, I.H.; VOGT M. Involvement of 5-hydroxytryptamine-containing neurons in antinociception produced by injection of morphine into nucleus raphe magnus or onto spinal cord. **Brain Research**. v. 306, p. 341-348. 1984.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy Pharmacology**. v. 52, p. 253-262. 2000.

VIKMAN, K.S., DUGGAN, A.W., SIDDALL, P.J. Increased ability to induce long-term potentiation of spinal dorsal horn neurones in monoarthritic rats. **Brain Research**. v. 990, p. 51-57, 2003.

VINEGAR, R., et al. Antagonism of pain and Hyperalgesia. In: VANE, J.R.; FERREIRA, S.H. (eds). **Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol. 50/II, Anti-inflammatory Drugs. Springer-Verlag, Berlin, p. 208–22. 1979.

VIVIANI, B., et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **Journal of Neuroscience**. v. 23, p. 8692-8700. 2003.

WARNCKE, T.; JORUM, E.; STUBHAUG, A. Local treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine, inhibits development of secondary hyperalgesia in man by a peripheral action. **Neuroscience Letters**. v. 227, p. 1-4.1997.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neuroscience**. v. 24, n. 8, p. 450-455. 2001.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Review Drug Discovery**. v. 2, p. 973-985. 2003.

WEI, F., et al. Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. **Journal of Neuroscience**. v. 26, p. 851-861. 2006.

WELCH, S.P.; DUNLOW, L.D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 267, p. 390-399. 1993.

WEN, Z.H., et al. Intrathecal pertussis toxin induces thermal hyperalgesia: involvement of excitatory and inhibitory amino acids. **Neuroscience**. v. 116, p. 871-878. 2003.

WHO. World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999. 295 p. 1v.

WHO. World Health Organization. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2000. 80 p.

WHO. World Health Organization. **WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002. 74 p.

WHO. World Health Organization. **Tradicional Medicine**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print/html>. Acesso em 29 de abril de 2010.

WIECH, K., et al. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesthesia and Analgesia**. v. 98, p. 408-413. 2004.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochemistry International**. v. 45, p. 389-395. 2004.

WILLIS, W. D.; COGGESHALL, R. E. **Sensory Mechanisms of the Spinal Cord**. New York: Plenum Press. 1991. 595 p.

WILLIS, W. D. Jr.; COGGESHALL, R. E. Ascending sensory tracts and their descending control. In: WILLIS W. D.; COGGESHALL R. E., ed. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 857-881. 2004.

WITTERT, G.; HOPE, P.; PYLE, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochemical and Biophysics Research Communications**. v. 218, 877-881, 1996.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Science**. v. 74, n. 21, p.2605-2610. 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**. v.288, n.5472, p.1765-1769. 2000.

YANG. L., et al. A novel Ca²⁺-independent signaling pathway to extracellular signal-regulated protein kinase by coactivation of NMDA receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in neurons. **Journal of Neuroscience**. v. 24, p. 10846-10857. 2004.

YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Tratamento multidisciplinar dos doentes com dor crônica. **Prática Hospitalar**. 35, 2004.

YOSHIKAWA, M., et al. Activation of supraspinal NMDA receptors by both D-serine alone or in combination with morphine leads to the potentiation of antinociception in tail-flick test of rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 565, p. 89-97. 2007.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Science**. v. 101, p. 107-117. 2006.

YOSHIMURA, M.; YONEHARA, N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. **Neuroscience Research**. v. 56, p. 21-28. 2006.

ZANCHET, E.M.; LONGO, I.; CURY, I. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanooids in pain facilitation induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Brain Research**. v.1021, p.101-111. 2004.

ZHANG, G.H., et al. Inhibition of the N-methyl-d-aspartate receptor unmasks the antinociception of endogenous opioids in the periphery. **Pain**. v. 143, p. 233-237. 2009.

ZHANG, R.X., et al. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. **Pain**. v. 135, p. 232-239. 2008.

ZHANG, X., et al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**. v. 82, n.1, p.223-40. 1998.

ZHANG, X., et al. Effect of morphine on cholecystokinin and mu-opioid receptor-like immunoreactivities in rat spinal dorsal horn neurons after peripheral axotomy and inflammation. **Neuroscience**, v. 95, n.1, p.197-207. 2000.

ZHONG, J., et al. Dual modulation of excitatory synaptic transmission by agonists at group I metabotropic glutamate receptors in the rat spinal dorsal horn. **Brain Research**. v. 887, p. 359-377. 2000.

ZHOU, S., et al. Metabotropic glutamate 1alpha receptors on peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. **Brain Research**. v. 91, p. 18-26. 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p. 109-110. 1983.

APÊNDICE- Protocolo para verificação da atividade da monoaminaoxidase-A (MAO A) *in vitro*

Foram utilizados homogenatos de membranas de encéfalo de camundongos e quinuramina como substrato e a análise foi realizada por meio de método fluorimétrico conforme previamente descrito (MATSUMOTO et al., 1985; SANT'ANNA et al., 2009). Os ensaios foram realizados em duplicata em volume final de 500 μ L contendo 0,25 (0,5 mg/mL) mg de proteína incubada a 37 °C por 30 min. A atividade da isoforma A foi mensurada na presença de selegilina (250 nM, inibidor seletivo da MAO-B). A mistura reacional (contendo as frações de homogenato, TTHL e inibidor da MAO-B) foi pré-incubada a 37 °C por 5 min e a reação fluorimétrica foi iniciada pela adição de 50 μ L de quinuramina (60 μ M). O TTHL foi testado nas concentrações de 0,1 e 1 mM. Os valores estão expressos como nmol/min/mg de proteína.

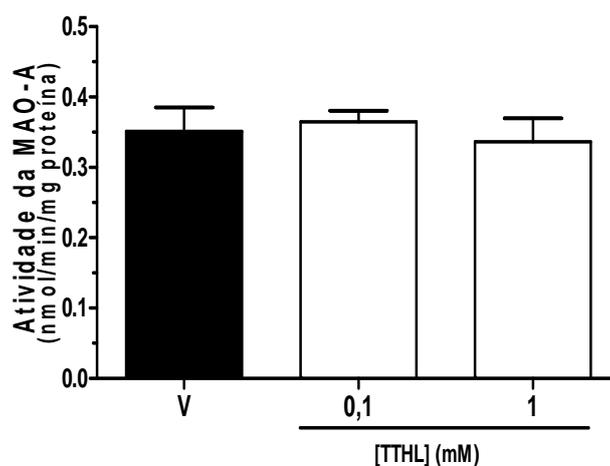


Figura 24 – Efeito do TTHL (0,1-1 mM) na atividade da isoforma A da enzima MAO. As colunas representam 1 experimento em duplicata e as linhas verticais o E.P.M. ANOVA de uma via. O TTHL não alterou a atividade da MAO-A.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo científico publicado no European Journal of Pharmacology

European Journal of Pharmacology 623 (2009) 30–36



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Neuropharmacology and Analgesia

Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptorsDaniela Tagliari Longhi-Balbinot^a, Evelise Fernandes Pietrovski^b, Vinicius Maria Gadotti^{a,1}, Daniel Fernandes Martins^a, Valdir Alves Facundo^c, Adair Roberto Soares Santos^{a,*}^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil^b Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 88015-420, PR, Brazil^c Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho 78900-500, RO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2009

Received in revised form 31 August 2009

Accepted 8 September 2009

Available online 15 September 2009

Keywords:

Triterpene

Antinociception

Ionotropic glutamate receptor

Metabotropic glutamate receptor

ABSTRACT

The present study investigated the possible involvement of the glutamatergic and neurokinin systems in the antinociception caused by triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene (TTHL) in mice. TTHL given by intraperitoneal (i.p., 2.1–65.5 μ mol/kg), intraplantar (i.pl., 6.5–65.5 nmol/paw) or intrathecal (i.t., 21.8–655 nmol/site) routes, produced dose-dependent inhibition of glutamate-induced nociception with ID₅₀ values of 12 μ mol/kg; 34.2 nmol/paw; 233.8 nmol/site and inhibitions of 78 \pm 6; 82 \pm 4 and 77 \pm 8%, respectively. I.t. injection of TTHL (6.5–218 nmol/site, co-administered) also caused significant and dose-dependent reduction of nociceptive response induced by i.t. injection of glutamate (175 nmol/site), with ID₅₀ value of 54.5 nmol/site and inhibition of 51 \pm 6%. Moreover, TTHL (65.5 nmol/site) co-injected by i.t. route with agonist caused marked reduction of nociceptive responses induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA, 450 pmol/site), (\pm)-1-aminocyclopentane-trans-1,3 dicarboxylic acid (trans-ACPD, 10 nmol/site) and substance P (100 pmol/site), with inhibitions of 81 \pm 7; 79 \pm 7; 81 \pm 11%, respectively. Conversely, TTHL had no effect on α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA, 135 pmol/site) and kainic acid (kainate, 110 pmol/site)-induced nociception. Moreover, the association of sub-effective doses of TTHL (6.5 nmol/site, i.t.) and MK-801 (1 nmol/site, i.t.; non-competitive NMDA antagonist) or (RS)-MCPG (30 nmol/site, i.t.; non-selective group I/group II metabotropic glutamate receptor antagonist) produced a synergic antinociceptive effect in the nociception induced by NMDA or trans-ACPD, respectively. Together, these results provide experimental evidence for the involvement of the glutamatergic system (NMDA and metabotropic glutamate receptors) in the antinociceptive action caused by TTHL in mice.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – Artigo científico submetido à publicação no *European Journal of Pharmacology*

Elsevier Editorial System(tm) for *European Journal of Pharmacology*
Manuscript Draft

Manuscript Number: EJP-32581

Title: Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice

Article Type: Research Paper

Section/Category: Neuropharmacology and analgesia

Keywords: triterpene, antinociception, opioid, serotonin, Gi/o protein activation, K⁺ channels

Corresponding Author: Dr Adair Roberto Soares Santos, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Catarina

First Author: Daniela T Balbinot, PhD student

Order of Authors: Daniela T Balbinot, PhD student; Daniel F Martins, PhD student; Débora Lanznaster, MSc Student; Morgana D Silva, PhD student; Valdir A Facundo, PhD; Adair Roberto Soares Santos, PhD

Abstract: The present study investigated the mechanisms involved in the antinociception produced by the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene (TTHL) in mice. Oral administration of TTHL inhibited glutamate-induced nociception with an ID₅₀ of 19.0 (13.2-27.5) mg/kg and an inhibition of 56 \pm 3 %. This action started 60 min (inhibition of 59 \pm 6%) after p.o. administration and remained significant up to 6 h (inhibition of 37 \pm 6%). The antinociception of TTHL was reversed by the pre-treatment of mice with naloxone (1 mg/kg; non-selective opioid receptor antagonist), D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP, 1 mg/kg; selective μ -opioid receptor antagonist), nor-binaltorfimine (1 mg/kg; selective κ -opioid receptor antagonist), naltrindol (3 mg/kg; selective δ -opioid receptor antagonist), p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg for 4 consecutive days; inhibitor of serotonin synthesis), WAY100635 (0.5 mg/kg; selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) and ketanserin (0.3 mg/kg; selective 5-HT_{2A} receptor antagonist) but not by L-arginine (600 mg/kg; nitric oxide precursor) or ondansetron (0.5 mg/kg; 5-HT₃ receptor antagonist). Furthermore, the TTHL antinociceptive effect was prevented by intrathecal (i.t.) pre-treatment with pertussis toxin (0.5 μ g/site; inactivator of Gi/o protein), charybdotoxin (250 pg/site; blocker of large-conductance calcium-gated K⁺ channels), tetraethylammonium (1 μ g/site; blocker of voltage-gated K⁺ channels) and glibenclamide (80 μ g/site; blocker of ATP-gated K⁺ channels) but not by apamin (50 ng/site; blocker of small-conductance calcium-gated K⁺ channels). These results showed that the TTHL antinociceptive effect is dependent on opioid and serotonergic systems, Gi/o protein activation and the opening of specific K⁺ channels. Thus, TTHL could represent an important compound for the treatment of pain.