

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO 3,4,5-
TRIMETOXIDIHIDROCIÂNICO EXTRAÍDO DE *Piper tuberculatum* JACQ.

DÉBORA LANZMASTER

Florianópolis – SC

Outubro 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO 3,4,5-
TRIMETOXIDIHIDROCIÂNICO EXTRAÍDO DE *Piper tuberculatum* JACQ.

DÉBORA LANZMASTER

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares
dos Santos

Florianópolis – SC

Outubro 2009

*“Bastava apenas o minúsculo, simples
e indolor esforço de decidir.*

E ir em frente.”

Amir Klink

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe, Denise, porque com certeza sem ela eu não estaria aqui. Não apenas pelo fato de ter me posto no mundo e me criado, mas por ser grande responsável por quem sou hoje, por sempre me apoiar e achar que eu sou capaz. E também por ser essa mulher guerreira, que nunca desistiu frente às adversidades do caminho. E principalmente, nunca desistiu de mim. Eu te amo, mamis!

Ao meu pai, que ao seu modo de demonstrar seu amor, sempre fez tudo o que estava ao seu alcance pra me ver feliz. Eu te amo, papai!

À vovó Edith e tia Loni, por sempre estarem lá pela minha mãe e pelo carinho enorme que tem por mim. À minha prima-irmã Natalia, obrigada por ser essa pentelha que eu amo tanto!

À Fer, minha flor, amiga desde a 1ª fase, que me ajudou a crescer nessa ilha cheia de naufrágios... "Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você..." Eu te amo, Fêrrr!

Aos amigos que a Biologia me trouxe: Celo, Ana, Fran, Aninha, Tiri, Marcela, Gabi, que tornaram esses anos muito mais agradáveis de viver.

À minha "marida", Marina (orra!), pela parceria desde sempre, por ser minha companheira e fiel escudeira. Por tornar meus dias mais alegres, pela paciência, pelo convívio. Obrigada, Bandida!

Aos companheiros de laboratório: Dani, Cris Baggio e Cris Setim, Morg, Maria Fernanda, Fran, Tati, Gaúcho, Ney, Chico, Nay, Bira, Dani&Leidi, Vanessa, Marcieli, Serginho. Pelo clima ótimo no trabalho, pela sintonia que não se encontra em nenhum outro laboratório. Obrigada, amigos!

Ao orientador Adair, que ao me tornar responsável pela execução de um projeto, me fez crescer pessoal e profissionalmente. Pelos auxílios financeiros,

por desacreditar e acreditar. Por ter me dado a chance de conhecer e me apaixonar pela pesquisa. Adair, esse trabalho não aconteceria sem você. MUITÍSSIMO obrigada!

Ao seu Carlos e dona Vilma, pela alegria do dia-a-dia e por tornarem meus dias na Fisiologia mais coloridos.

Agradeço também a todos que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho, mas que eu tenha esquecido de mencionar.

***“Se pude ver além dos demais, é
porque me pus de pé
sobre os ombros de um gigante”***

Newton

RESUMO

Recentemente, demonstrou-se que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocínâmico (TMDC), extraído de *Piper tuberculatum*, possui efeito antinociceptivo significativo quando testado no modelo do ácido acético. Este estudo visa confirmar esta atividade, bem como estender os dados sobre este composto. Os animais (ratos Wistar e camundongos Swiss) foram tratados via i.p. com o TMDC, em diferentes doses, 30 min antes da realização dos testes. O modelo inicial escolhido foi a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina, que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção. O TMDC reduziu o comportamento nociceptivo relativo à primeira fase deste modelo (Inibição: $72 \pm 5\%$), porém não foi capaz de reduzir a segunda fase desta nocicepção. No modelo de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, o TMDC mostrou-se eficaz na dose de 10 mg/kg (Inibição: $42 \pm 10\%$). O efeito anti-hiperalgésico (térmico e mecânico) do TMDC foi testado frente a administração de BK, PGE2, Cg e PMA, e verificou-se que este reverteu as hiperalgias induzidas pela BK e pelo PMA. A participação do sistema de cininas no efeito antinociceptivo do TMDC foi verificado através da injeção i.pl. de BK em ratos e da injeção i.t. de BK em camundongos, sendo que o composto foi capaz de inibir apenas o comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.t. (Inibição: $67 \pm 11\%$). Dentre os receptores TRP, apenas o TRPV1 parece estar envolvido no efeito antinociceptivo do TMDC, uma vez que o TMDC foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina (Inibição: $63 \pm 6\%$), mas não de cinamaldeído (agonista TRPA1) e mentol (agonista TRPM8). O efeito antinociceptivo do TMDC não está relacionado a nenhum efeito inespecífico, visto que não altera a atividade locomotora dos animais nos testes da barra giratória e campo aberto. Em conjunto, esses dados sugerem a interação direta ou indireta do TMDC com receptores importantes envolvidos na transmissão dolorosa, bem como apontam para a utilização do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocínâmico e da *P. tuberculatum* como medicamentos úteis para a intervenção e controle da dor.

Palavras-chave: *Piper tuberculatum*, nocicepção, TMDC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Plantas medicinais.....	1
1.2 Família Piperaceae e Gênero <i>Piper</i>	2
1.3 <i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	4
1.4 Dor	6
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material botânico.....	11
3.1.1 Coleta e identificação.....	11
3.1.2 Preparação da fração e isolamento do composto.....	12
3.2 Animais.....	12
3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	13
3.3.1 Nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	13
3.3.2 Nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	13
3.4 Hiperalgesia mecânica e térmica em ratos.....	13
3.5 Participação do sistema de cininas no efeito antinociceptivo do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.....	14
3.6 Participação dos receptores TRP no efeito antinociceptivo do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.....	14
3.6.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	15
3.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos.....	15
3.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos.....	15
3.7 Efeito sobre a atividade locomotora de camundongos.....	16
3.8 Análise Estatística.....	16
4 RESULTADOS.....	16
4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.....	16
4.1.1 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pela formalina.....	16

4.1.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pelo glutamato.....	17
4.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a hiperalgesia térmica e mecânica.....	18
4.3 Participação do sistema de cininas na antinocicepção induzida pelo ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.....	20
4.4 Participação dos receptores TRP no efeito antinociceptivo do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.....	21
4.4.1 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pela capsaicina.....	21
4.4.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pelo cinamaldeído.....	22
4.4.3 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pela mentol.....	22
4.5 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre o desempenho motor no teste de atividade espontânea de camundongos.....	23
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Desde a antiguidade, o homem busca na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida, aumentando sua chance de sobrevivência. O uso das plantas como alimento sempre existiu, e a este se incorporou a busca de matéria prima para confecção de roupas e ferramentas. A observação das variações sazonais mostradas pelas plantas provocou um deslumbramento em seus observadores, que culminou por criar um respeito místico às plantas. Assim, plantas com propriedades alucinógenas logo foram incorporadas aos rituais religiosos, e a elas foram atribuídas propriedades mágicas de colocar os homens em contato com os deuses (Lorenzi; Matos, 2002). O ópio, extraído da papoula (*Papaver somniferum*), era comumente utilizado pelos sacerdotes sumerianos em seus rituais e para aliviar a dor em doentes agonizantes – daí serem considerados representantes de Deus ou ainda deuses da morte (Brownstein, 1993). Ao longo dos anos, alguns observadores perceberam que uma erva capaz de induzir sonolência seria também capaz de acalmar, quando usada em doses menores. O papiro de Ebers (1500 A.C.) descreve um “remédio para acabar com o choro de crianças” feito a partir da papoula (*P. somniferum*) (Brownstein, 1993). Deste modo, o conhecimento sobre a propriedade medicinal da flora foi passado ao longo de gerações, que em conjunto com os mitos e rituais, formavam parte importante das culturas locais.

Os primeiros europeus que chegaram ao Brasil se depararam com uma grande quantidade de plantas medicinais utilizadas pelas inúmeras tribos indígenas que aqui viviam. Tais conhecimentos foram logo absorvidos pelos europeus que passaram a viver no país, dada a necessidade de se viver do que a natureza oferecia localmente. Além disso, muitas plantas conhecidas no velho mundo por suas propriedades medicinais levaram os europeus a testarem usos similares para as espécies nativas proximamente relacionadas (Mors *et al.*, 2000).

Com o início da industrialização no século XX e subsequente urbanização do Brasil, o conhecimento tradicional passou a ser posto em

segundo plano, aliado ao afastamento entre o estudo das plantas medicinais e o restante da ciência. Este afastamento ocorreu devido à ampla resistência da ciência em aceitar as profundas alterações que tanto a sistemática quanto a medicina experimentaram no final de século XIX e todo o século XX (Lorenzi; Matos, 2002). Além disso, o estudo das plantas medicinais, fortemente baseado em estudos clássicos, mostrou uma grande resistência inicial em acompanhar as grandes revoluções científicas ocorridas neste período.

Nos últimos anos, as novas tendências globais no que diz respeito a uma preocupação com a biodiversidade e a idéia de desenvolvimento sustentável despertou novamente um interesse geral na fitoterapia. Até a década de 70 as grandes indústrias farmacêuticas não tinham qualquer projeto de pesquisa na área de produtos naturais. Atualmente, porém, pelo menos metade das 250 maiores companhias farmacêuticas do mundo financiam programas de pesquisa nesta área (Yunes; Calixto, 2001; Pinto *et al.*, 2002). Em algumas áreas, como no tratamento do câncer, cerca de 60% dos medicamentos disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas (Calixto, 2000).

Acompanhando esta mudança, novas linhas de pesquisa foram estabelecidas nas Universidades – consideradas centros de pesquisa na área de produtos naturais e no descobrimento de novas entidades químicas – em busca de bases mais sólidas para a validação científica do uso de plantas medicinais (McCurdy; Scully, 2005). Além disso, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados, com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros, facilitando o crescimento da fitomedicina nacional (Elizabetsky; Costa-Campos, 1996).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal no mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas – aproximadamente 20% da diversidade biológica vegetal do planeta – fornecendo um potencial imenso para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (Calixto, 2000). As duas principais vias de identificação de plantas com atividade biológica são o conhecimento das práticas tradicionais (ou etnofarmacologia), e a triagem aleatória de plantas, sendo a primeira mais vantajosa por permitir o planejamento da

pesquisa de novos fármacos a partir do conhecimento empírico já existente (Yunes; Calixto, 2001).

1.2 Família Piperaceae e Gênero *Piper*

A família Piperaceae, classificada entre as mais primitivas famílias de angiospermas, é constituída de 10 a 12 gêneros e um grande e incerto número de espécies, estimado entre 1.400 e 2.000, que habitam lugares úmidos e sombrios das regiões tropicais (Cronquist, 1981; Joly, 1991). As plantas pertencentes a esta família possuem importância econômica, ecológica e medicinal, sendo que muitas espécies tem sido utilizadas na alimentação e na medicina popular para o tratamento de muitas patologias do aparelho respiratório (asma, bronquite e tosse), do aparelho digestivo (dores abdominais e diarreias), e doenças venéreas. São também utilizadas como antiinflamatória (reumatismo), antimicrobiana (antibacterianas, antifúngicas, tratamento de feridas), antileucêmica e anti-helmíntica (Leal, 2000). Em virtude destas inúmeras indicações terapêuticas, as Piperaceae constituem uma fonte interessante para a pesquisa fitoquímica e biológica (Benevides *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 1995).

A família Piperaceae, no Brasil, é representada praticamente em todos os estados do país, principalmente pela espécie *Piper nigrum*, a pimenta do reino, que fora introduzida no século XVII pelos portugueses. Tomando-se apenas o estado do Ceará como exemplo, são compreendidos 35 taxa da família Piperaceae distribuídos em quatro gêneros: *Ottonia*, *Pothomorphe*, *Peperomia* e *Piper* (Guimarães; Giordiano, 2004). Muitas destas espécies são utilizadas popularmente como condimento (principalmente os frutos), ornamentação e por suas propriedades medicinais – através de chás, infusão, banhos aromáticos, tanto das raízes quanto do caule e dos frutos (Guimarães; Giordiano, 2004).

O gênero *Piper* tem mais de 1.000 espécies que se distribuem geograficamente pelas regiões subtropicais (Dyer *et al.*, 2004), tropicais e temperadas dos dois hemisférios (Guimarães; Giordiano, 2004). Este gênero apresenta uma das maiores diversidades de taxa nos países neotropicais, em que corresponde a cerca de 2/3 de todas as espécies neles descritas. Muitas

plantas deste gênero crescem em florestas quentes, úmidas e com alto índice pluviométrico. Aproximadamente, 300 espécies são endêmicas do sudeste da Ásia, incluindo o leste das ilhas da Índia e o norte da Austrália. Na América Central, há ocorrência de cerca de 90 espécies na Península Osa na Costa Rica, como também em alguns países da América do Sul (Dyer *et al.*, 2004).

No Brasil ocorrem cerca de 266 espécies do gênero *Piper* (Guimarães; Giordiano, 2004). Em geral, são sub-arbustos, arbustos ou arvoretas com 1 a 5 metros, podendo atingir até 10 metros de altura. Os caules são mais ou menos lignificados, nodosos e ramosos. As folhas possuem pecíolo longo e se apresentam alternas no caule. O limbo é simples e a sua margem é inteira, apresentam diferentes formas e tamanho variável, podendo atingir em algumas espécies até 40 cm de comprimento. As flores são sésseis, dispostas em espigas opostas às folhas, variando de comprimento e espessura, e os frutos são drupas globosas com pericarpo pouco espessado (Moreira *et al.*, 2000; Reitz, 2003; Guimarães; Giordiano, 2004).

Investigações fitoquímicas realizadas com espécies do gênero *Piper* têm conduzido ao isolamento de várias classes de compostos ativos, tais como: amidas, alcalóides, profenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, dihidrochalconas, flavonas e flavononas (Parmar *et al.*, 1997). Silva e colaboradores (2007) demonstraram que os extratos das folhas e raízes de *P. aduncum* possuem atividade inseticida sobre adultos de *Aetalion sp* (cigarrinha). Os óleos essenciais das partes aéreas de plantas dessa espécie, coletadas em diferentes localidades da região Amazônica, apresentaram grandes concentrações do fenilpropanóide dilapiol, o qual foi considerado o responsável pelo efeito inseticida, relatado por Maia e colaboradores (1998). Outra espécie de relevante valor comercial é a *P. hispidinervum* por apresentar um óleo essencial rico em safrol, um fenilpropanóide, muito utilizado nas indústrias de cosméticos e inseticidas (Bergo *et al.*, 2005). Recentemente, a atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* do óleo essencial de quatro espécies de *Piper* da região Amazônica (*P. gaudichaudianum*, *P. permucronatum*, *P. humaytanum* e *P. hostmanianum*) foi divulgada por Moraes e colaboradores (2007).

O histórico do gênero *Piper* descrito por Parmar e colaboradores (1997), relata o uso de várias espécies para o tratamento de algumas enfermidades em

diferentes povos. Na China, algumas prescrições recomendam o uso das folhas de *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica, dores estomacais são tratadas com infusão das folhas de *P. aduncum* e *P. hispidum*. No México e no Brasil, são utilizadas folhas de *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções. Folhas e talos de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas, na Paraíba, contra picada de cobra e como sedativo (Chaves *et al.*, 2006; Araújo-Júnior *et al.*, 1999).

1.3 *Piper tuberculatum* Jacq.

A espécie *P. tuberculatum* (Figura 1) apresenta-se como arbustos com 2 - 2,5 m de altura, e ramos pubérulos. As folhas possuem bainha alada, lâmina oblongo-elíptica ou ovado-elíptica, base assimétrica e ápice agudo, de textura papiráceo-membranácea, brilhante; nervuras ascendentes em número de 8-10 pares, penínérveas, dispostas até o ápice da lâmina (Figura 2). As espigas são eretas, com 4-7 cm comprimento; bractéolas triangular-subpeltadas, marginalmente franjadas e a drupa é tetragonal, ovada ou subobovada, lateralmente comprimida (Guimarães; Giordiano, 2004).



Figura 1. Frutos e folhas de *P. tuberculatum*, em seu ambiente natural (Cortesia Dra. Rosely Valéria Rodrigues).

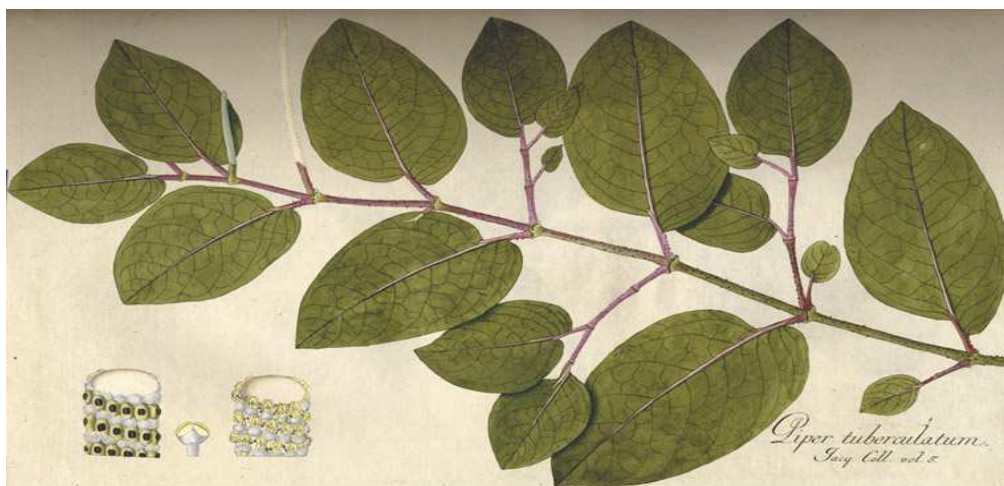


Figura 2. Ramo de *P. tuberculatum* com folhas e frutos (Rodrigues, 2009).

Sua distribuição geográfica estende-se por todo Continente Americano e Antilhas. No Brasil, é encontrada nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Cresce em altitudes aproximadas aos 550 m, em encosta úmida, em capoeira e em locais brejosos.

P. tuberculatum é conhecida popularmente como pimenta d'ardo, Jaborandi-falso, ou ainda como jamburana (Lorenzi; Matos, 2002; Guimarães; Giordiano, 2004). É uma planta medicinal utilizada popularmente como estimulante e carminativa (redução dos gases intestinais), além de sedativo, antídoto para veneno de cobra, dor de dente (Araújo-Júnior *et al.*, 1999) e para problemas estomacais (Chaves *et al.*, 2003). Recentemente, Cícero Bezerra Felipe e colaboradores (2007) demonstraram que a piplartina, um alcalóide isolado de *P. tuberculatum*, possui efeito sedativo e antidepressivo em camundongos. Além disso, estudos feitos por Bezerra e colaboradores (2007, 2008) demonstraram que o referido composto tem a capacidade de inibir a proliferação de células leucêmicas, enquanto que a propriedade antitumoral de alcalóides de *P. tuberculatum* foi demonstrada quanto à sua atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais (Tsai *et al.*, 2005). Além disso, a atividade antitumoral da piplartina está relacionada à inibição da taxa de proliferação tumoral, observada através da redução da reação com Ki67, um anticorpo monoclonal que identifica um antígeno nuclear associado às fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, em tumores de animais tratados (Bezerra *et al.*, 2006).

1.4 Dor

A integridade dos organismos vivos é garantida através da interação de dois sistemas altamente especializados: o sistema imune e o sistema nervoso. O principal componente do sistema nervoso central, o encéfalo, tem a capacidade de receber e integrar as informações recebidas de todas as partes do organismo (Julius; Basbaum, 2001). Assim, o encéfalo tem a habilidade de recordar e detectar qualquer agressão. Considerando que em condições fisiológicas as atividades do sistema imune nunca atingem a consciência, a dor é o mecanismo utilizado pelo organismo como alerta sobre a presença de um estímulo agressor (Vanderah, 2007), e resulta em estratégias comportamentais complexas no intuito de evitar contato com tal estímulo (Latremoliere; Woolf, 2009). A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a lesões reais ou potenciais, ou descrita em termos de tais lesões”. Portanto a dor possui um caráter fisiológico e outro subjetivo/psicológico, dependente de um processamento cognitivo e emocional no encéfalo (Julius; Basbaum, 2001). O componente fisiológico da dor é denominado nocicepção, que consiste na recepção dos estímulos nocivos pelos nociceptores – estruturas especializadas localizadas nas terminações dos neurônios sensoriais primários – que codificam e conduzem os sinais do estímulo nocivo aos centros superiores do SNC, onde ocorrerá a interpretação consciente da dor (Wall; Melzack, 1999; Julius; Basbaum, 2001).

As fibras aferentes primárias possuem características bastante distintas (por exemplo, limiares de ativação e sensibilidade) em relação a outras fibras sensoriais nervosas. As fibras A β , por exemplo, são mielinizadas e de alto calibre, responsáveis por detectar estímulos inócuos aplicados na pele, músculos e articulações, e por isso não estão, normalmente, relacionadas à transmissão dolorosa. Já as fibras C e A δ , de menor calibre, estão relacionadas à transdução e condução do estímulo nociceptivo; enquanto as fibras C são não-mielinizadas, as fibras A δ são pouco mielinizadas, possuindo maior velocidade de condução do impulso nervoso que as primeiras (Julius; Basbaum, 2001). Algumas características inerentes a cada fibra estão

apresentadas na Figura 3. Além disso, os nociceptores são considerados polimodais pela variedade de estímulos – químicos, mecânicos e térmicos – capazes de ativá-los (Costigan & Woolf, 2000; Julius & Basbaum, 2001).

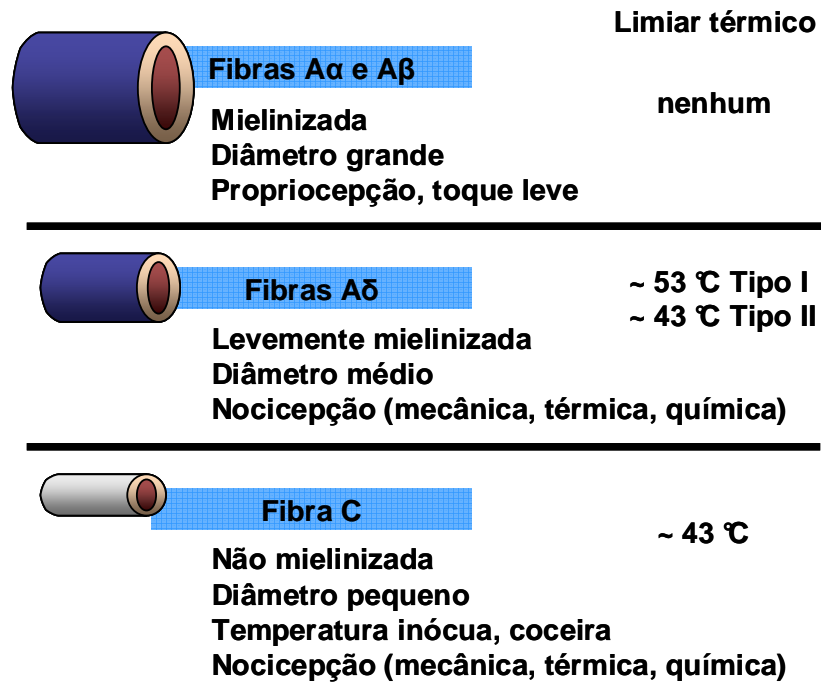


Figura 3. Diferentes tipos de fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius; Basbaum, 2001.

Entretanto, em algumas situações a dor não representa mais seu papel protetor, podendo surgir espontaneamente a partir de uma hipersensibilidade dolorosa, sendo provocada por estímulos normalmente inócuos – onde recebe o nome de alodínia –, ou ainda ser exagerada e prolongada frente um estímulo nocivo – por isso denominada hiperalgesia (Loeser; Treede, 2008). Esta hipersensibilidade dolorosa surge como resultado de uma sensibilização central e periférica, provocada por um estímulo nocivo persistente ou uma resposta inflamatória. Este evento induz plasticidade no sistema nervoso caracterizada por aumento no número de espinhos dendríticos, brotamento de novos botões sinápticos e aumento na expressão de alguns receptores presentes nos nociceptores, entre outros (Latremoliere; Woolf, 2009). Assim, a sensibilização é caracterizada por atividade espontânea dos neurônios, aumento da resposta a estímulos supraliminares e diminuição do limiar de ativação dos nociceptores,

induzidas pela plasticidade. Além disso, esse processo de sensibilização leva à ativação de nociceptores silenciosos, denominados assim por não se excitarem frente estímulos fisiológicos ou dolorosos (Woolf, 1989).

O glutamato, um aminoácido excitatório, é o neurotransmissor predominante em todos os nociceptores – bem como na maioria das sinapses no SNC – e está diretamente envolvido com a propagação da informação dolorosa aos centros superiores (Julius; Basbaum, 2001; Beirith *et al.*, 2002). Muitas dores clínicas persistentes são dependentes, pelo menos em parte, do aumento na eficácia sináptica da sinalização glutamatérgica nas vias nociceptivas (Bleakman *et al.*, 2006). O glutamato exerce suas ações através de dois grupos distintos de receptores, um formado por receptores acoplados a canais iônicos – denominados ionotrópicos – e outro formado por receptores acoplados à proteína G – denominados metabotrópicos. Alguns autores sugerem que a plasticidade sináptica associada à sensibilização central depende principalmente das alterações induzidas nas propriedades biofísicas dos receptores ionotrópicos de glutamato (por exemplo, receptores AMPA e NMDA) (Ji *et al.*, 2003; Borsook *et al.*, 2007).

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resulta da liberação local de mediadores químicos tais como a bradicinina, prótons, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, citocinas, aminoácidos excitatórios, opióides, entre outros (Julius; Basbaum, 2001; Rocha *et al.*, 2007). Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando à propagação do sinal nociceptivo graças ao aumento na permeabilidade da membrana neuronal aos cátions e consequente geração do potencial de ação (Raja *et al.*, 1999; Costigan; Woolf, 2000). É importante ressaltar que estes mediadores podem ser liberados não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por fibras do sistema nervoso autônomo simpático e células não neuronais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e células inflamatórias (Besson, 1997).

Quando o estímulo provoca a lesão tecidual, há o desencadeamento do processo inflamatório. As células lesadas liberam enzimas de seu interior, que no ambiente extracelular degradam ácidos graxos de cadeia longa e atuam

sobre os cininogênios, dando origem à formação de cininas. As cininas são pequenos polipeptídeos da α 2-calicreína presente no plasma ou nos líquidos orgânicos. A calicreína, uma enzima proteolítica que é ativada pela inflamação, atua imediatamente sobre a α 2-globulina, liberando a cinina denominada calidina, que é, assim, convertida em bradiginina por enzimas teciduais (cininases). Uma vez formada, a bradiginina provoca intensa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória (Regoli *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2007). Quando outra enzima, a fosfolipase A, age sobre a membrana celular, provoca a liberação de ácido araquidônico, que ao ser metabolizado por ciclooxygenases e/ou lipoxigenases produz prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (O'Banion, 1999). Estes mediadores, a bradiginina e principalmente a prostaglandina E2, causam alterações em receptores específicos (receptores TRP) acoplados a canais iônicos ativados por ligantes via ativação do AMPc, e das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, reduzindo o limiar de excitabilidade dos nociceptores (Rocha *et al.*, 2007).

Os receptores TRP, sigla para *transient receptor potential*, constituem uma família de canais catiônicos localizados nos terminais periféricos dos nociceptores e responsáveis pela detecção do estímulo nocivo, uma vez que sua ativação contribui para a geração do potencial de ação necessário para transmissão da informação nociceptiva (Tominaga, 2007). Além disso, estes receptores possuem a capacidade de detectar temperaturas frias ou quentes, particularmente temperaturas nocivas (abaixo de 17 °C ou acima de 43 °C), sendo a maioria ativada por substâncias naturais (Cortright *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, embora tenha ocorrido significativo progresso científico na elucidação da neurobiologia da transmissão dolorosa, especialmente pela aplicação de técnicas modernas de eletrofisiologia e biologia molecular, é grande a necessidade e procura por analgésicos mais eficazes para uso clínico, com o menor número possível de efeitos colaterais (Calixto *et al.*, 2000).

Recentemente, foi demonstrado o efeito antinociceptivo do extrato bruto, frações e três compostos obtidos a partir dos frutos de *P. tuberculatum* sobre a nocicepção visceral induzida por ácido acético (Rodrigues *et al.*, 2009). Dentre

os compostos, o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), o composto isolado mais potente entre os tratamentos testados, foi 7.700 vezes mais potente que ácido acetil salicílico (aspirina), um anti-inflamatório não-esteroidal bastante utilizado na clínica.

Considerando a potência do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico observada no estudo mencionado, além da necessidade de se encontrar novos fármacos mais potentes e eficazes no tratamento da dor, este trabalho busca estender os dados até agora presentes na literatura, bem como elucidar alguns mecanismos de ação deste composto isolado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), extraído dos frutos de *Piper tuberculatum*, em modelos experimentais que utilizam estímulos químicos, mecânicos e térmicos em camundongos e ratos, bem como elucidar alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a atividade antinociceptiva do TMDC nos modelos de nocicepção química induzida por formalina e glutamato em camundongos;
- ✓ Verificar o efeito do TMDC em modelos de hiperalgesia térmica (método Hargreaves) e mecânica (modelo Randall-Selitto), induzidas por diferentes agentes algogênicos, em ratos;
- ✓ Verificar a participação do sistema de cininas, em especial a bradicinina, no efeito antinociceptivo do TMDC, em camundongos e ratos;
- ✓ Verificar a participação de receptores TRP, especificamente TRPV1, TRPA1 e TRPM8, no efeito antinociceptivo do TMDC em camundongos;
- ✓ Verificar o possível efeito sedativo ou músculo-relaxante do TMDC em camundongos, submetidos aos testes de campo aberto e da barra giratória.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

3.1.1 Coleta e identificação

Os frutos de *Piper tuberculatum* foram coletados em setembro de 2005 no município de Porto Velho, Rondônia, Brasil. A identificação botânica da planta foi realizada no herbário do Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde um exemplar encontra-se depositado sob o número 211724.

3.1.2 Preparação da fração e isolamento do composto

Os frutos devidamente secos e triturados (1,1 Kg) foram extraídos com etanol (3 L x 3) à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida e forneceu 36,0 g de resíduo de coloração marrom. Parte deste material (30,0 g) foi adsorvido em sílica gel (90,0 g) e a mistura, sob a forma de pasta, foi colocada em uma coluna cromatográfica e eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol:água 85:15, obtendo-se os eluatos (frações) com os respectivos rendimentos: 22,9% para o eluato hexânico, 21,3% para o eluato diclorometano, 22,3% do eluato acetato de etila, 30,0% no eluato metanólico e 2,4% para o eluato metanol:água. A partir da fração acetato de etila (5,13 g), aplicada em coluna de sílica gel utilizando como fase móvel hexano, hexano/clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio/metanol e metanol, em polaridade crescente, obteve-se 4,49% de um sólido branco amorfo. Após análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, espectros de massas e a comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C da literatura (Facundo *et al.*, 2005), foi possível propor a estrutura do **ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico** {3,4,5-trimethoxydyhydrocinnamic acid} (TMDC, Figura 4).

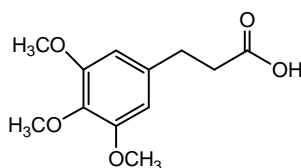


Figura 4. Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC), extraído dos frutos de *P. tuberculatum*.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (30-40g) e ratos Wistar (180-250g) de ambos os sexos, obtidos do Biotério Central da UFSC, aclimatados a 22 ± 2 °C em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h), e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos no laboratório 1 h antes da realização dos experimentos para aclimação. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com animais de laboratório, e o número de animais e a intensidade do estímulo nocivo usados foram o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos (Zimmermann, 1983). Os experimentos conduzidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC, sob o protocolo 23080.003593/2008-84.

3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

3.3.1 Nocicepção induzida pela formalina em camundongos

Para confirmação do efeito antinociceptivo do TMDC, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela formalina, que permite avaliar a nocicepção de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos; 1º fase, 0–5 min) e a nocicepção de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores envolvidos na inflamação; 2º fase, 15–30 min). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (Hunskaar; Hole, 1987). Os animais receberam 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar (*i.pl.*) da pata posterior direita. O tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo este comportamento considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados pela via intraperitoneal (*i.p.*) com o composto isolado TMDC (0,03 – 3 mg/kg), ou apenas salina (grupo controle, 10 ml/kg), 30 min antes da injeção irritante.

3.3.2 Nocicepção induzida por glutamato em camundongos

Através desse modelo, pretendeu-se analisar a possível ação modulatória do composto TMDC sobre a nocicepção induzida por glutamato (20 μ mol/pata), sendo este neurotransmissor um dos mais importantes na transmissão nociceptiva (Beirith *et al.*, 2002). Os animais foram tratados com o composto TMDC (0,1 – 30 mg/kg) ou salina (grupo controle, 10 ml/kg) via *i.p.* 30 min antes de receberem a injeção de 20 μ l de glutamato tamponado na pata posterior direita. O tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 15 min, sendo este tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os procedimentos utilizados foram similares aos descritos anteriormente (Beirith *et al.*, 2002).

3.4 Hiperalgisia mecânica e térmica em ratos

O possível efeito anti-hiperalgésico mecânico e térmico do composto TMDC foi avaliado utilizando os métodos descritos por Randall e Selitto (1957) e Hargreaves e colaboradores (1988), respectivamente. O peso no analgesímetro variou de 0 a 750 g e o limiar nociceptivo foi expresso como carga tolerada (em g). Para o limiar nociceptivo térmico os ratos foram habituados ao ambiente aproximadamente 10 min antes da realização do teste, e as latências de retirada da pata expostas à fonte radiante (radiação infravermelha) foram registradas automaticamente. O tempo de corte utilizado para o experimento foi de 20 s, para evitar possíveis danos teciduais. Os ratos foram tratados com 100 μ l de carragenina (Cg, 300 ng/pata), bradicinina (BK, 3 nmol/pata), prostaglandina E₂ (PGE₂, 10 nmol/pata), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 100 μ mol/pata), ou somente salina (100 μ l/pata), na região intraplantar da pata posterior direita. A hiperalgisia foi avaliada 4 horas após a injeção de Cg e 30 min após a injeção das demais substâncias. No modelo de hiperalgisia induzida por BK, os animais foram pré-tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina, captopril (5 mg/kg, *i.p.*), 1 hora antes dos experimentos, para prevenir a degradação da BK (Otuki *et al.*, 2005). Os animais foram pré-tratados com o TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (grupo controle, 10 ml/kg, *i.p.*), 30 min antes da administração dos agentes irritantes.

3.5 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico na nocicepção induzida pela bradicinina administrada por diferentes vias

O possível efeito do composto TMDC sobre a ação periférica de mediadores inflamatórios, em especial a bradicinina (BK), foi analisado através da injeção de BK na parte ventral da pata posterior direita (adaptado de Ferreira *et al.*, 2004). Os animais (ratos Wistar) foram pré-tratados com TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (10 ml/kg, *i.p.*) 30 min antes da injeção de 100 µl de BK (3 nmol/pata) na região plantar da pata posterior direita e foram ambientados individualmente em funis de vidro, sendo avaliado o tempo em que o animal permaneceu sacudindo (*flinching*) a pata injetada durante 10 min. Com o objetivo de avaliar o envolvimento de receptores para a BK em nível central no efeito antinociceptivo do TMDC, 0,1 µg/sítio de BK foi administrado via intratecal (*i.t.*) em camundongos, conforme descrito por Hylden e Wilcox (1980), sendo o comportamento de lambem e/ou morder a região do corpo posterior ao local da injeção (entre as vértebras L5 e L6) considerado como indicativo de nocicepção e contabilizado durante 10 min. Os animais foram previamente tratados com o composto TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (10 ml/kg, *i.p.*) (grupo controle).

3.6 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida por agonistas de canais TRP

3.6.1 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

A fim de verificar a participação dos receptores TRPV1 na antinocicepção induzida pelo TMDC, os animais receberam injeção *i.pl.* de capsaicina (1,6 µg/pata, 20 µl), e o tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi considerado como indicativo de nocicepção (Santos; Calixto, 1997). Os animais foram pré-tratados com o composto TMDC (0,0001 – 1 mg/kg) ou salina (grupo controle, 10 ml/kg), 30 min antes da injeção de capsaicina. Após receberem o estímulo, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro, e a nocicepção foi cronometrada cumulativamente durante 5 min.

3.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído em camundongos

A fim de verificar a participação dos receptores TRPA1 na antinocicepção promovida pelo TMDC, foi realizado o modelo de nocicepção induzida por cinamaldeído (agonista de receptores TRPA1), descrito por Andrade e colaboradores (2008). Decorridos 30 min do tratamento com o TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (10 ml/kg, *i.p.*; grupo controle), os animais receberam 20 µl de solução de cinamaldeído (10 nmol/pata, *i.pl.*) na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como índice de nocicepção.

3.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol em camundongos

Para avaliar a participação de receptores TRPM8 na atividade antinociceptiva do TMDC, foram realizados experimentos de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de mentol (agonista de receptores TRPM8), (Freitas, 2009). Decorridos 30 min do tratamento com o TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (grupo controle; 10 ml/kg, *i.p.*), os animais receberam 20 µl de solução de mentol (1%, *i.pl.*) na pata traseira direita. Após, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro transparentes, sendo que o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 20 min e considerado como índice de nocicepção.

3.7 Efeito sobre a atividade locomotora de camundongos

Visando verificar um possível efeito sedativo ou músculo-relaxante do composto TMDC, os animais foram submetidos ao teste da barra giratória (Santos *et al.*, 1999) e do campo aberto (Rodrigues *et al.*, 1996). O teste do campo aberto consiste em uma caixa retangular (40 cm x 50 cm x 60 cm), cujo chão é dividido em 12 quadrados de mesma área. O número de cruzamentos efetuados com as quatro patas foi cumulativamente contado durante 6 min. O teste da barra giratória foi conduzido no aparelho Rota Rod (Ugo Basile, Modelo 7600), que consiste numa barra com 2,5 cm de diâmetro, subdividida

em quatro compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. A barra é dotada de rotação constante (21 rotações/minuto), sendo mensurado o tempo em que o animal permaneceu na barra por três períodos consecutivos de 60 s. Em ambos os experimentos, os animais foram pré-tratados com TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) ou salina (10 ml/kg, *i.p.*), 30 min antes de serem submetidos aos testes.

3.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto as DI_{50} (doses do composto isolado capazes de reduzir 50% da resposta nociceptiva quando comparado com o grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As DI_{50} foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando o método de regressão não-linear através do programa “Graph Pad Prism” (2005, San Diego, CA). A análise estatística dos resultados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando o método de Newman Keuls, para os dados paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico

4.1.1 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pela formalina

Na Figura 5 pode-se observar a ação do TMDC sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. O TMDC (0,03 – 3 mg/kg, *i.p.*) inibiu de forma dependente da dose a nocicepção de origem neurogênica (Figura 5A), porém não foi capaz de alterar a fase inflamatória da nocicepção induzida pela formalina (Figura 5B). A DI_{50} calculada para a 1ª fase foi de 0,20 (0,14 – 0,29) mg/kg e inibição de $72 \pm 5\%$ na dose de 3 mg/kg.

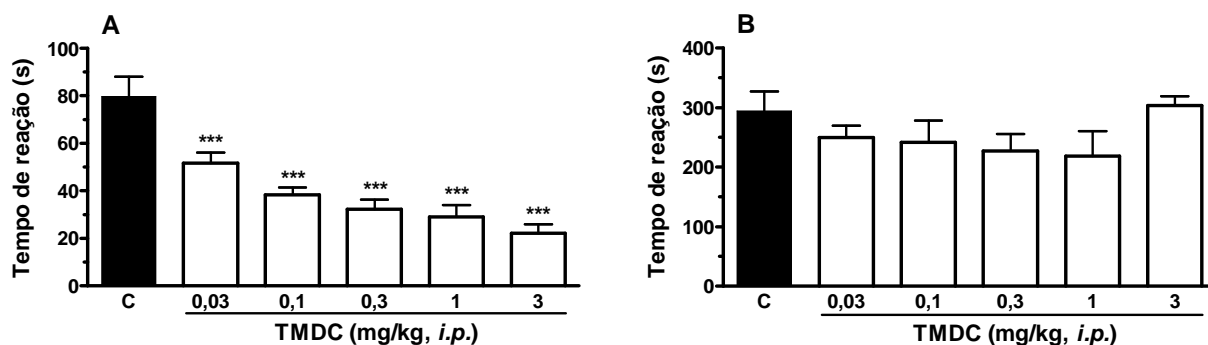


Figura 5: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculosis* administrado em camundongos na nocicepção de origem neurogênica (A) e inflamatória (B) induzida pela formalina (2,5%, *i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle (C): *** $p < 0,001$.

4.1.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pelo glutamato

A Figura 6 mostra que o TMDC (0,1 – 30 mg/kg) foi capaz de inibir de maneira significativa a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato tamponado em camundongos, com inibição de $42 \pm 10\%$ na dose de 10 mg/kg quando comparado ao grupo controle (C).

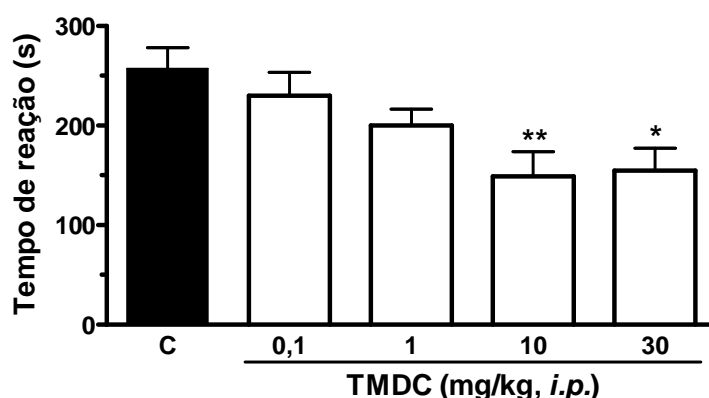


Figura 6: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculosis* administrado em camundongos, na nocicepção induzida por glutamato tamponado (1,6%, *i.pl.*). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

4.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a hiperalgesia térmica e mecânica em ratos

Nos testes de hiperalgesia térmica e mecânica, o TMDC foi capaz de reverter completamente a hiperalgesia induzida pela injeção de BK (Figura 7 A-B), alcançando inibição de $89 \pm 11\%$ e $99 \pm 1\%$ nas hiperalgesias térmica e mecânica, respectivamente. Além disso, o TMDC foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela injeção de PMA (Figura 7 C-D), com inibição de $61 \pm 8\%$ na hiperalgesia térmica e $46 \pm 10\%$ na hiperalgesia mecânica.

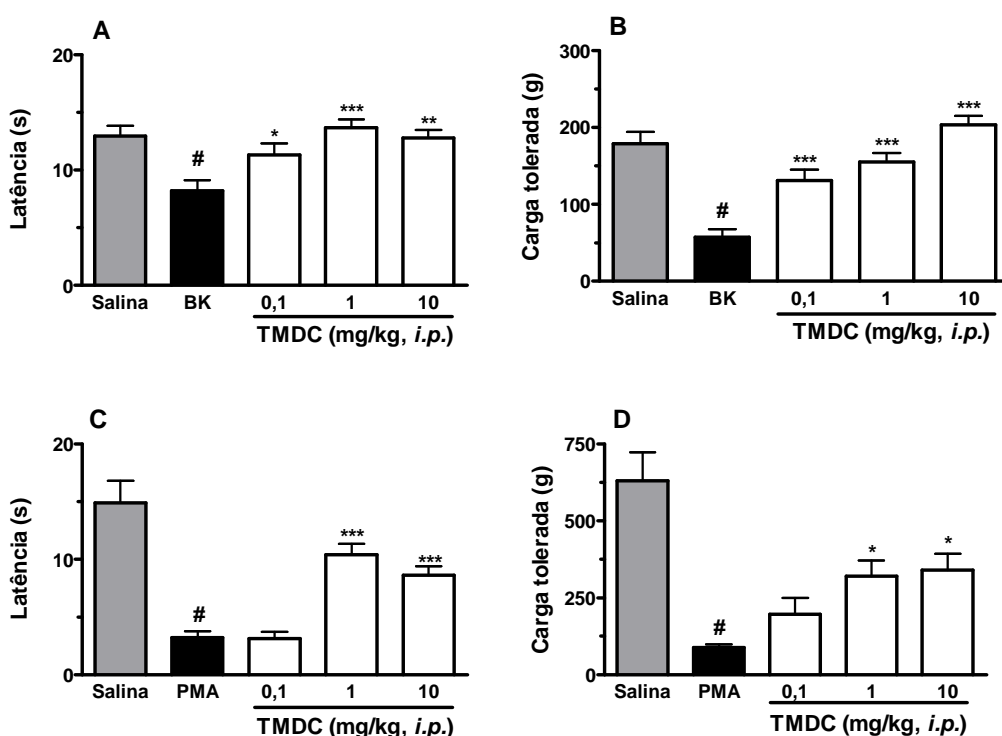


Figura 7: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na hiperalgesia térmica (A,C) e mecânica (B,D) induzidas pela bradicinina (BK; A-B) e PMA (C-D), em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle: *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. Diferente do grupo salina: # $p < 0,05$.

Contudo, o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico não reverteu o efeito hiperalgésico induzido pela prostaglandina E_2 (Figura 8 A-B) e pela Cg (Figura 8 C-D).

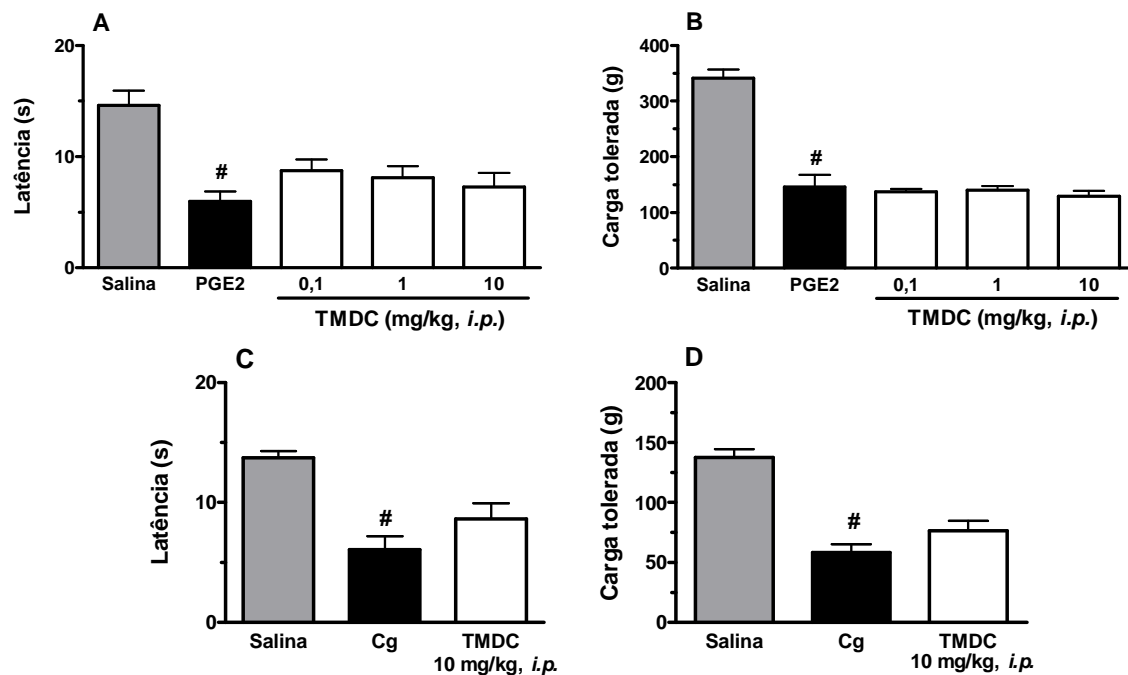


Figura 8: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na hiperalgesia térmica (A,C) e mecânica (B,D) induzidas pela prostaglandina E₂ (PGE₂; A-B) e carragenina (Cg; C-D), em ratos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n= 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo salina: # $p < 0,05$.

4.3 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico na nocicepção induzida pela bradicinina administrada por diferentes vias

O TMDC, administrado sistemicamente, não foi capaz de inibir a nocicepção espontânea induzida pela administração *i.pl.* de bradicinina na pata de ratos (Figura 9). O comportamento nociceptivo (*flinching*) foi contabilizado durante 10 min.

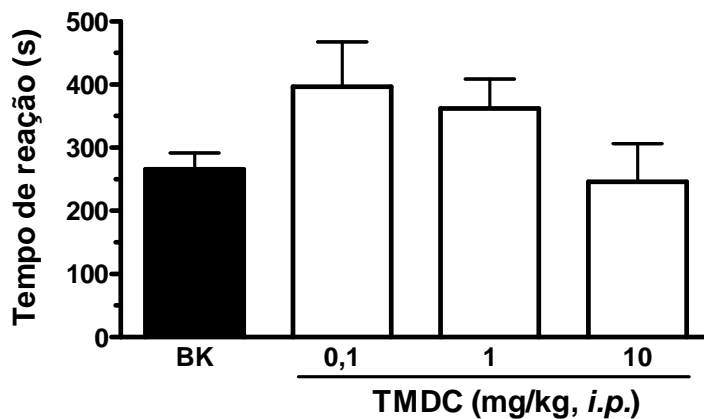


Figura 9: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na nocicepção induzida pela bradicinina (3 nmol, *i.pl.*) em ratos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5 a 10).

Contudo, o TMDC foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de bradicinina, alcançando inibição de $67 \pm 11\%$ na maior dose testada e DI50 de 4,66 (1,58 – 13,75) mg/kg (Figura 10).

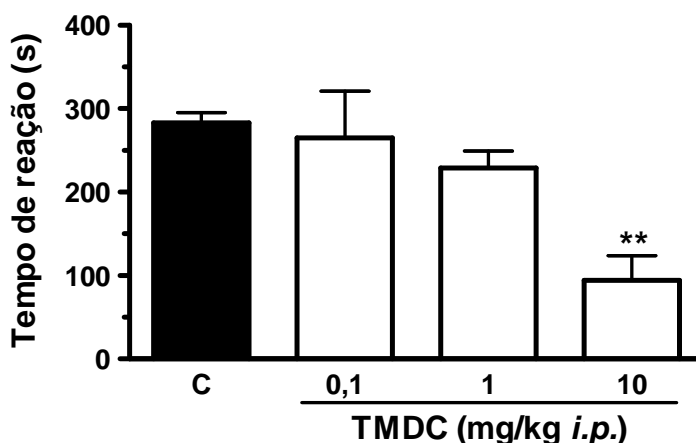


Figura 10: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico isolado de *P. tuberculatum* na nocicepção induzida pela bradicinina (*i.t.*) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle: ** $p < 0,01$.

4.4 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida por agonistas de canais TRP

4.4.1 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pela capsaicina

No teste da capsaicina, o TMDC (0,0001 – 1 mg/kg) apresentou uma inibição igual a $63 \pm 6\%$ na maior dose testada, e DI50 de 0,29 (0,17 – 0,49) mg/kg (Figura 11).

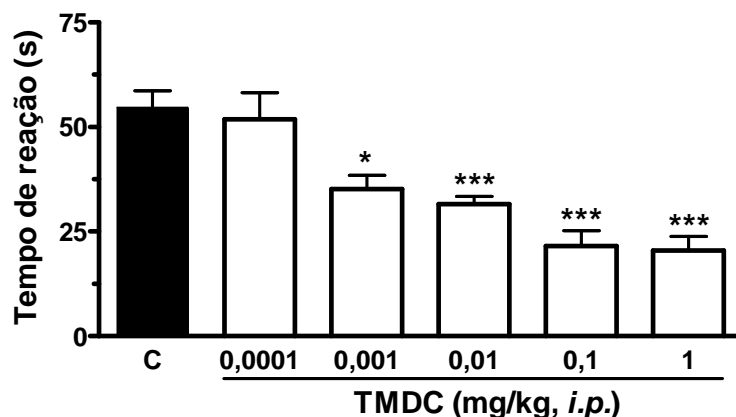


Figura 11: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na nocicepção induzida pela capsaicina (1,6%, *i.pl.*) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n= 5 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Diferente do grupo controle: *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

4.4.2 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pelo cinamaldeído

No teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído, o TMDC não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo decorrente da ativação direta dos receptores TRPA1, como pode ser observado na Figura 12.

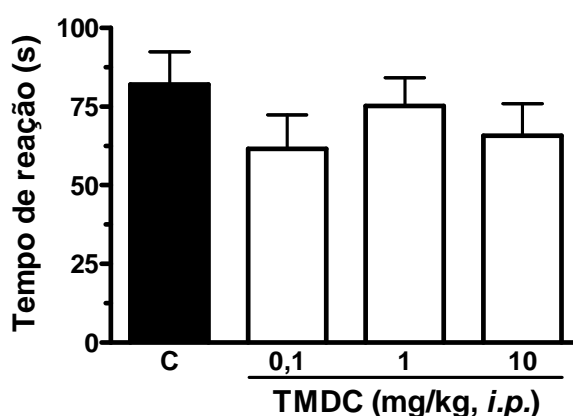


Figura 12: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na nocicepção induzida pelo cinamaldeído (10 nmol/pata, *i.pl.*) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n= 5 a 10).

4.4.3 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre a nocicepção induzida pelo mentol

O TMDC, administrado via *i.p.*, não foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo induzido pela injeção *i.pl.* de mentol, agonista de receptores TRPM8, como pode ser observado na Figura 13.

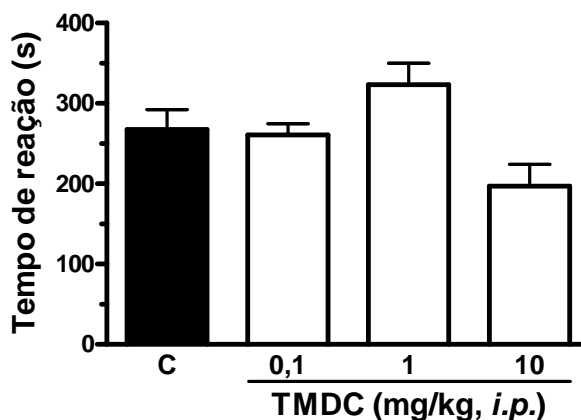


Figura 13: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculatum* na nocicepção induzida pelo mentol (1%, *i.pl.*) em camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n= 5$ a 10).

4.5 Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico sobre o desempenho motor no teste de atividade espontânea de camundongos

O tratamento dos animais com doses do TMDC (0,1 – 10 mg/kg, *i.p.*) que apresentaram significativo efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção mostrados anteriormente, não provocou alterações na atividade locomotora dos animais submetidos aos testes de campo aberto e barra giratória, conforme os resultados apresentados na Figura 14.

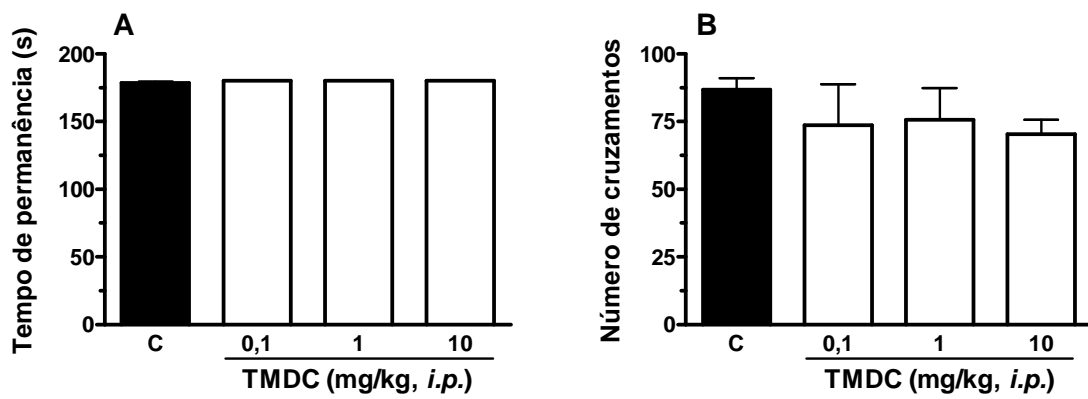


Figura 14: Efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico (TMDC) isolado de *P. tuberculosis* nos testes da barra giratória (A) e campo aberto (B) realizados com camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5 a 6).

5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico, um composto isolado dos frutos de *P. tuberculatum*, administrado sistemicamente, apresenta significativo efeito antinociceptivo quando analisado em diferentes modelos de nocicepção química, térmica e mecânica, em ratos e camundongos.

Recentemente, Rodrigues e colaboradores (2009) reportaram o efeito antinociceptivo do extrato bruto, frações e três alcalóides obtidos a partir dos frutos de *P. tuberculatum* sobre a nocicepção visceral induzida por ácido acético, demonstrando que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico possui uma atividade antinociceptiva significativa neste modelo. O modelo de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético na cavidade peritoneal é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes – naturais ou sintéticos – com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (Collier *et al.*, 1968; Tjølsen & Hole, 1997). Por induzir a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina, interleucinas e substância P (Collier *et al.*, 1968; Vineger *et al.*, 1979; Ribeiro *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001), excita os nociceptores, aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cérebro-espinhal (Feng *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004). Em função disto, este modelo apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade, sendo sensível a agentes anti-inflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos (Feng *et al.*, 2003).

Assim, optou-se por iniciar o presente estudo através do modelo de nocicepção induzida pela formalina, desenvolvido a mais de 30 anos para analisar drogas analgésicas em animais de laboratório, e que consiste na injeção de solução de fomaldeído na superfície plantar da pata posterior direita do animal (Dubuisson & Dennis, 1977). Este modelo permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a primeira de origem neurogênica – ou seja, provocada pela ativação direta dos nociceptores – e a segunda de origem inflamatória, resultado da sensibilização dependente da atividade dos neurônios do SNC no corno da medula espinhal (Tjølsen *et al.*, 1992). O

tratamento dos animais com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico foi capaz de reverter, de forma dependente da dose, a primeira fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, porém não alterou a resposta nociceptiva dos animais durante a segunda fase deste modelo. Estudos demonstram que este modelo de nocicepção é resistente à maioria dos anti-inflamatórios não-esteroidais, enquanto é sensível ao tratamento com dipirona, opióides como a morfina e fármacos que antagonizam os receptores de substância P e glutamato (Sakurada *et al.*, 1992; Santos; Calixto, 1997).

Podemos observar no presente estudo que o tratamento dos animais com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico também foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato na pata de camundongos. O glutamato e seus receptores compreendem o sistema de neurotransmissores excitatórios mais importantes do sistema nervoso de mamíferos. Vários estudos demonstram que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato envolve sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais, tendo ação amplamente mediada pela ativação de receptores NMDA e não-NMDA, assim como pela liberação de óxido nítrico ou por algumas vias de transmissão moduladas por nitro derivados (Beirith *et al.*, 2002, 2003; Rosa *et al.*, 2005). Além disso, está bem estabelecido na literatura que os receptores de aminoácidos excitatórios estão envolvidos na transmissão da informação aferente primária nociceptiva, tanto no desenvolvimento como na manutenção da resposta dolorosa (Beirith *et al.*, 2002; Bleakman *et al.*, 2006). Desta forma, a diminuição do comportamento nociceptivo induzido pelo glutamato em camundongos, observado após o tratamento dos animais com ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico, pode estar associada à interação deste com o sistema glutamatérgico, ou ainda com a inibição da produção de óxido nítrico (Ferreira *et al.*, 1999; Beirith *et al.*, 2003).

Muitos pacientes acometidos de dor também apresentam quadros de hipersensibilidade – ou hiperalgesia – caracterizados pela diminuição do limiar nociceptivo e associados à sensibilização das fibras sensoriais nociceptivas pelo aumento na secreção de mediadores inflamatórios (Julius; Basbaum, 2001). O efeito do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico em modelos de hiperalgesia térmica e mecânica foi verificado após a administração de diferentes agentes algogênicos, e pode-se observar que o pré-tratamento dos

animais com o composto reverteu completamente a hiperalgesia induzida pela injeção de bradicinina. Vários mediadores inflamatórios produzem nocicepção sensibilizando fibras sensoriais periféricas e centrais, por meio da ativação de proteínas quinases, como proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteínas ativadas por mitógeno (MAPK) (Scholz; Woolf, 2002). Sabe-se que a hiperalgesia (bem como a nocicepção espontânea) induzida pela bradicinina é provocada pela ativação indireta da PKC, bem como pela sensibilização de receptores TRPV1, modulando a liberação de vários mediadores (Ferreira *et al.*, 2004). Interessantemente, o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico também foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo PMA, um ativador direto da PKC.

Vários estudos de eletrofisiologia, farmacologia e biologia celular sugerem que a bradicinina, através da interação com receptores B1 e B2, desempenham papel importante no controle de processos dolorosos (Ferreira *et al.*, 2002), sendo este último constitutivamente expresso, enquanto a expressão do receptor B1 é induzida mediante ativação do sistema de citocinas (Regoli *et al.*, 1998). O tratamento dos animais com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico não foi capaz de inibir a nocicepção espontânea induzida pela injeção intraplantar de bradicinina em ratos. Porém, quando administrada intratecalmente em camundongos, a bradicinina induz comportamento nociceptivo que é reduzido significativamente após o tratamento com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico, na maior dose utilizada. Estudos *in vitro* identificaram os receptores B1 e B2 nos terminais de neurônios sensoriais na medula espinhal (Steranka *et al.*, 1988; Wotherspoon; Winter, 2000), e a ativação destes receptores é capaz de despolarizar neurônios em preparações de medula espinhal (Dunn; Rang, 1990; Pesquero *et al.*, 2000), induzindo a liberação de neuropeptídeos (Andreeva; Rang, 1993; Wang; Fiscus, 1997) que contribuem para a propagação e manutenção do processo doloroso. Assim, sugere-se que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico não age diretamente sobre os receptores periféricos de bradicinina, mas pode exercer seu efeito através da interação com os receptores centrais, ou ainda modular a atividade de mediadores produzidos após sua ativação.

A participação dos receptores TRP – especificamente TRPV1, TRPA1 e TRPM8 – no efeito antinociceptivo do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico foi

analisado através da injeção intraplantar de agonistas dos receptores mencionados – capsaicina, cinamaldeído e mentol, respectivamente (Patapoutian *et al.*, 2009). Os membros da família de receptores de potencial transitório (TRP) estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos (Bautista *et al.*, 2006). O receptor vanilóide (TRPV1) é expresso principalmente em neurônios sensoriais periféricos (fibras C e A δ) sendo ativado por diferentes estímulos dolorosos, incluindo prótons, calor, alguns mediadores lipídicos e compostos vanilóides como a capsaicina, o princípio pungente da pimenta vermelha (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998, Zygmund *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). O TRPV1 está envolvido na nocicepção, contribuindo tanto na integração como na detecção de estímulos químicos e térmicos (Caterina *et al.*, 2000). Também já foi demonstrado que o receptor TRPV1 é ativado pela bradicinina de forma independente do receptor de bradicinina, sendo que a sensibilização pela bradicinina ocorre através dos sistemas de sinalização das proteínas PKC e PKA (Bandell *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Neste estudo, o tratamento dos animais com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico foi capaz de inibir significativamente e de forma dependente da dose a nocicepção induzida pela capsaicina, um agonista de canais TRPV1.

O receptor TRPA1 foi caracterizado como um termorreceptor de frio nocivo (Story *et al.*, 2003). É seletivamente expresso em fibras sensoriais peptidérgicas que também expressam TRPV1, o que explica seu possível papel no processo nociceptivo (Story *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2005). Além disso, McNamara e colaboradores (2007) demonstraram que a formalina ativa as fibras aferentes primárias por meio da ativação direta de canais TRPA1, sendo esta ativação responsável pela primeira fase da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os dados publicados no presente estudo demonstram que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico foi capaz de inibir significativamente a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, porém não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído, um agonista direto de canais TRPA1. Assim, sugere-se que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico não atue diretamente sobre os agonistas de canais TRPA1, mas sim sobre outros mecanismos desencadeados pela administração de formalina, uma vez que a administração de cânfora, um

antagonista de canais TRPA1, não foi capaz de reverter completamente a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina (dados não publicados).

Recentemente, nosso grupo de trabalho (Freitas, 2009) demonstrou que a ativação dos receptores TRPM8, através da injeção intraplantar de mentol, promove dor espontânea em camundongos. No presente estudo, o tratamento dos animais com o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico não foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida pela injeção de mentol.

O efeito antinociceptivo do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico em camundongos não está relacionado a algum efeito sedativo e músculo-relaxante, observados nos testes de campo aberto e da barra giratória. Estes resultados sugerem que este composto, nas doses que produz efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção citados anteriormente, não produz efeito inespecífico tanto no sistema nervoso central como periférico.

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico consegue modular negativamente os mecanismos desencadeados pela sensibilização/ativação dos canais TRPV1, possivelmente através da interação com os receptores centrais de bradicinina e conseqüente ativação da PKC. Além disso, sugerem a participação do sistema glutamatérgico nesta atividade. Porém, estudos adicionais são necessários para confirmação destas hipóteses, bem como para elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que:

1. O TMDC possui significativo efeito antinociceptivo sobre a nocicepção de origem neurogênica induzida pela formalina e sobre a nocicepção induzida pelo glutamato, em camundongos;
2. O TMDC reverte significativamente as hiperalgesias térmicas e mecânicas induzidas pela administração de BK e PMA em ratos;
3. O TMDC inibe significativamente a nocicepção induzida pela injeção *i.t.* de bradicinina em camundongos;
4. O TMDC possui pronunciado efeito antinociceptivo e dependente da dose no modelo de nocicepção induzida pela administração de capsaicina, um agonista do receptor TRPV1;
5. A antinocicepção do TMDC em camundongos não está relacionada a algum efeito sedativo e músculo-relaxante, observados nos testes de campo aberto e da barra giratória;

Em síntese, o presente estudo demonstrou que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico isolado de *P. tuberculatum* realmente apresenta um importante efeito antinociceptivo em vários modelos animais de nocicepção que

utilizam estímulos térmico, químico e mecânico. O mecanismo de ação não está completamente elucidado; contudo, neste estudo foi demonstrado que o composto pode modular as respostas nociceptivas induzidas pela ativação de receptores e canais iônicos importantes na transmissão dolorosa. Neste sentido, os dados apresentados neste estudo sugerem que o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico contribui significativamente para o efeito da *P. tuberculatum*. Assim, tanto a *P. tuberculatum* quanto o ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinâmico podem constituir-se em produtos importantes para o desenvolvimento de medicamentos úteis para a intervenção e controle da dor.

REFERÊNCIAS

- Andrade, E.L.; Luiz, A.P.; Ferreira, J.; Calixto, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. *Neuroscience* 152: 511-520. 2008.
- Andreeva, L.; Rang, H.P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from de rat spinal cord *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 108: 185-190. 1993.
- Araújo-Júnior, J.X.; Chaves, M.C.O.; Cunha, E.V.L.; Gray, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 325-327. 1999.
- Bandell, M.; Story, G.M.; Hwang, S.W.; Viswanath, V.; Eid, S.R.; Petrus, M.J.; Earley, T.J.; Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849-857. 2004.
- Bautista, D.M.; Movahed, P.; Hinman, A.; Axelsson, H.E.; Sterner, O.; Hogestatt, E.D.; Julius, D.; Jordt, S.E.; Zygmunt, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:12248–12252. 2005.
- Bautista, D.M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P.R.; Read, A.J.; Poblete, J.; Yamoah, E.N.; Basbaum, A.I.; Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269–1282. 2006.

Beirith, A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. Mechanisms underlying the nociception an paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924: 219-228. 2002.

Beirith, A.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibre in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res.* 969: 110-116. 2003.

Benevides, P.J.C; SAartorelli, P.; Kato, M.J. Phenylpropanoids and Neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* 52 : 339-343. 1999.

Bergo, C.L.; Mendonça, H.A.; Silva, M.R. Efeito da época e freqüência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. *Acta Amazonica* 35(2): 111-117. 2005.

Besson, J. New drugs in the treatment of alcoholism. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 127: 1574-1578. 1997.

Bezerra, D.P.; Castro, F.O.; Alves, A.P.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Elmiro, F.J.; Costa-Lotufo, L.V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid-amides from *Piper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 801-807. 2006.

Bezerra, D.P.; Militão, G.C.; de Castro, P.O.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Elmiro, F.J.; Costa-Lotufo, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol. In Vitro.* 21: 1-8. 2007.

Bezerra, D.P.; Castro, F.O.; Alves, A.P.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Elmiro, F.J.; Alencar, N.M.; Mesquita, R.O.; Lima, M.W.; Costa-Lotufo, L.V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J. Appl. Toxicol.* 28: 156-163. 2008.

Bleakman, D.; Alt, A.; Nisenbaum, E.S. Glutamate receptors and pain. *Sem. in Cell & Develop. Biol.* 17: 592-604. 2006.

Borsook, D.; Becerra, L.; Carlezon Jr., W.A.; Shaw, M.; Renshaw, P.; Elman, I.; Levine, J. Reward-aversion circuitry in analgesia and pain: implications for psychiatric disorders. *Eur. J. Pain.* 11: 7-20. 2007.

Brownstein, M.J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5391-5393. 1993.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory quidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:179-189. 2000.

Calixto, J.B.; Beirith, A.; Ferreira, J.; Santos, A.R.S.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* 14: 401-418. 2000.

Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24. 1997.

Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K.R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A.I.; Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313. 2000.

Chaves, M.C.O.; Júnior, A.G.F.; Santo, B.V.O. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. *Fitoterapia* 74: 181-183. 2003.

Cícero Bezerra Felipe, F.; Trajano Sousa Filho, J.; de Oliveira Souza, L.E.; Alexandre Silveira, J.; Esdras de Andrade Uchoa, D.; Rocha Silveira, E.; Deusdênia Loiola Pessoa, O.; de Barros Viana, G.S. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressive effects in mice. *Phytomedicine* 14: 605-612. 2007.

Collier, H.D.J.; Dinnin, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 32: 295-310. 1968.

Cortright, D.N.; Krause, J.E.; Broom, D.C. TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772: 978-988. 2007.

Costigan, M.; Woolf, C.J. Pain: molecular mechanisms. *J. Pain* 1: 35-44. 2000.

Cronquist, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York Colombia University Press, p.1262, 1981.

Dyer, L.A.; Palmer, A.D.N. *Piper: A Model Genus for Studies of Pytochemistry, Ecology, and Evolution.* Kluwer Academic Publisher/New York, 2004.

Dubuisson, D.; Dennis, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4: 161-174. 1977.

Dunn, P.M.; Rang, H.P. Bradykinin-induced depolarization of primary afferent nerve terminals in the neonatal rat spinal cord *in vitro.* *Br. J. Pharmacol.* 100: 656-660. 1990.

Elizabetsky, E.; Costa-Campos, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *J. Ethnopharmacol.* 51: 111-120. 1996.

Facundo, V.A.; Pinto, A.S.S.; de Morais, S.M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 753-756. 2005.

Feng, Y.; Cui, M.; Willis, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology*. 98: 729-733. 2003.

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* 38: 835-842. 1999.

Ferreira, J.; Campos, M.M.; Araújo, R.; Pesquero, J.B.; Calixto, J.B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43:1188-1197. 2002.

Ferreira, J.; Da Silva, G.L.; Calixto, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 141: 787-794. 2004.

Freitas, C.S. Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da *Baccharis illinita* DC (Asteraceae). Curitiba, 2009. 115f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Guimarães, E.F.; Giordano, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. *Rodriguesia*, 55: 21-25. 2004.

Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-78. 1988.

Hwang, S.W.; Cho, H.; Kwak, J.; Lee, S.Y.; Kang, C.J.; Jung, J.; Cho, S.; Min, K.H.; Suh, Y.G.; Kim, D.; Oh, U. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 6155-6160. 2000.

Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103-114.

Hyden, J.L.; Wilcox, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67: 313-316. 1980.

Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H.; Oh-ishi, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci.* 69: 2911-2919. 2001.

Ji, R.R.; Kohno, T.; Moore, K.A.; Woolf, C.J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 26: 696-705. 2003.

Joly, A.B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo, Ed. Nacional, 10^a ed., p.777, 1991.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210. 2001.

Latremoliere, A.; Woolf, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain* 10: 895-926. 2009.

Leal, L.F. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. Florianópolis, 2000. 158f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Pós-Graduação em Química.

Loeser, J.D.; Treede, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137: 473-477. 2008.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP. 2002.

Maia, J.G.S.; Zohbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.R.S.; Silva, M.H.L.; Luz, A.I.R.; Bastos, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the amazon region. *Flavour and Fragrance Journal* 13(4): 269-272. 1998.

McCurdy, C.R.; Scully, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci.* 78: 476-484. 2005.

McNamara, C.R.; Mandel-Brehm, J.; Bautista, D.M.; Siemens, J.; Deranian, K.L.; Zhao, M.; Hayward, N.J.; Chong, J.A.; Julius, D.; Moran, M.M.; Fanger, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *PNAS* 104(33): 13525-13530. 2007.

Morais, S.M.; Facundo, V.A.; Bertini, L.M.; Cavalcanti, E.S.B.; Anjos Jr., J.F.; Ferreira, S.A.; Brito, E.S.; Souza, M.A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 670-675. 2007.

Moreira, D.L.; Guimarães, E.F.; Kaplan, M.A.C. A C – Glucosylflavone from Leaves of *Piper Ihotzkyanum*. *Phytochemistry* 55: 783-785. 2000.

Moreira, D.L.; Kaplan, M.A.C.; Guimarães, E.F. Constituintes Químicos de *Piper solmsianum* C.DC.(PIPERACEAE). *Revista Brasileira de Farmácia* 76(4): 106-109. 1995.

Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan. 2000.

Otuki, M.F.; Ferreira, J.; Lima, V.L.; Meyre-Silva, C.; Malheiros, A., Muller, L.A.; Cani, G.S.; Santos, A.R.S.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 310-318. 2005.

O'Banion, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit. Rev. Neurobiol.* 13: 45-82. 1999. Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tuagi, O.D.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olesen, C.E.; Boll, P.M.; Mensdelsohn, R. Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry* 46(4): 597-673. 1997.

Patapoutian, A.; Tate, S.; Woolf, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8: 55-68. 2009.

Pesquero, J.B.; Araújo, R.C.; Heppenstall, P.A.; Stucky, C.L.; Silva Jr., J.A.; Walther, T.; Oliveira, S.M.; Pesquero, J.L.; Paiva, A.C.; Calixto, J.B.; Lewin, G.R.; Bader, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8140-8145. 2000.

Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova* 25: 45-61. 2002.

Raja, I.A.; Azzoni, A.; Maisto, G. Three cases of improvement of tardive dyskinesia following olanzapine treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2: 333-334. 1999.

Randall, L.O.; Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111: 409-419. 1957.

Regoli, D.; Nsa Allogho, S.; Rizzi, A.; Gobeil, F.J. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 1-10. 1998.

Reitz, R. Piperaceae. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 4-7, 2003.

Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 111-118. 2000.

Rocha, A.P.C., Kraychete, D.C.; Lemonica, L.; Carvalho, L.R.; Barros, G.A.M.; Garcia, J.B.S.; Sakata, R.K. Dor: aspectos centrais da sensibilização periférica e central. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 57: 94-105. 2007.

Rodrigues, A.L.S.; Rocha, J.B.T.; Mello, C.F.; Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in openfield and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. & Toxicol.* 79: 150-156. 1996.

Rodrigues, R.V. Estudo fitoquímico dos frutos de *Piper tuberculatum* (Jacq.) e avaliação da atividade antinoceptiva e antiinflamatória dos extratos e constituintes identificados: piplartina, dihidropiplartina, e ácido 3,4,5-trimetóxi-dihidrocinâmico. Porto Velho, 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Rondônia, Núcleo de Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

Rodrigues, R.V.; Lanznaster, D.; Longhi-Balbinot, D.T.; Gadotti, V.M.; Facundo, V.A.; Santos, A.R.S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. *Bio. & Pharm. Bull.* 32(10): 1809-1812. 2009.

Rosa, K.A.; Gadotti, V.M.; Rosa, A.O.; Rodrigues, A.L.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neurosci. Lett.* 381: 185-188. 2005.

Sakurada, T.; Katsumata, K.; Tan-NO, K.; Sakurada, S.; Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonist in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31: 1279-1285. 1992.

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

Scholz, J.; Woolf, C.J. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 5: 1062-1067. 2002.

Silva, W.C.; Ribeiro, J.D.; Souza, H.E.M.; Corrêa, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amazônica* 37(2): 293-298. 2007.

Steranka, L.R.; Manning, D.C.; DeHaas, C.J.; Ferkany, J.W.; Borosky, S.A.; Connor, J.R.; Vavrek, R.J.; Stewart, J.M.; Snyder, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3245-3249. 1988.

Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S. Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-829. 2003.

Tjølsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Roland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17. 1992.

Tjølsen, A.; Hole K. The pharmacology of pain Vol 130, Cap. 1, eds. Dickenson, A.; Besson, J. Springer Verlag, Berlin, pp 1–20. 1997.

Tominaga, M.; Caterina, M.J.; Malmberg, A.B.; Rosen, T.A.; Gilbert, H., Skinner, K.; Raumann, B.E.; Basbaum, A.I.; Julius, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543. 1998.

Tominaga, M. Nociception and TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 179: 489-505. 2007.

Tsai, I.L.; Lee, F.P.; Wu, C.C.; Duh, C.Y.; Ishikawa, T.; Chen, J.J.; Chen, Y.C.; Seki, H.; Chen, I.S. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignin and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. *Planta Medica* 71: 535-542. 2005.

Vanderah, T.W. Pathophysiology of Pain. [The Medical Clinics of North America](#). 91: 1-12. 2007.

Vineger, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L.; Johnston, P.R. Handbook of experimental pharmacology. Vol 50, Cap. 2, eds. Vane J.R., Ferreira S.H. Springer Verlag, Berlin, pp 208-222. 1979.

Wall, P.D.; Melzack, R. *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

Wang,X.; Fiscus, R.R. Lactic acid potentiates bradykinin- and low-pH-induced release of CGRP from rat spinal cord slices. *Am. J. Physiol.* 273: E92-98. 1997.

Wang, S.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Obata, K.; Cui, X.; Tominaga, M.; Noguchi, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 131: 1241-1251. 2008.

Woolf, C.J. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth.* 63:139-146. 1989.

Wotherspoon, G.; Winter, J. bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci. Lett.* 294: 175-178. 2000.

Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. 1ª edição, Chapecó-SC, Argos – Editora Universitária. Cap. 7, p. 297-315. 2001.

Zhu, C.Z.; Wilson, S.G.; Mikusa, J.P.; Wismer, C.T.; Gauvin, D.M.; Lynch 3rd, J.J.; Wade, C.L.; Decker, M.W.; Honoré, P. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. *Eur. J. Pharmacol.* 506: 107–118. 2004.

Zygmund, P.M.; Petersson, J.; Andersson, D.A.; Chuang, H.; Sorgard, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457. 1999.

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