

**ANA PAULA LUIZ**

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DAS RAÍZES DA *Humirianthera*  
*ampla* Miers**

Florianópolis/SC

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DAS RAÍZES DA *Humirianthera*  
*ampla* Miers**

**ANA PAULA LUIZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**

Florianópolis/SC

2007

*“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.” (Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sérgio e Suzana, por apoiarem sempre as minhas decisões, e não medirem esforços para que elas se tornassem realidade. A vocês, todo o meu carinho e gratidão.

Ao orientador Adair Roberto Soares dos Santos, responsável pelo meu despertar para a pesquisa científica. Agradeço pela confiança em mim depositada. Saiba que levarei comigo mais que um aprendizado científico, em seu grupo de pesquisa aprendi que o companheirismo e a união tornam a nossa trajetória menos árdua e com um maior número de conquistas. Professor, muito obrigada!

À Flávia, que mais que uma amiga foi também minha co-orientadora, contribuindo substancialmente nos projetos em que trabalhei, saiba que tenho orgulho de ter sido sua IC. Mesmo longe, muito longe, muito obrigada!

A professora Mariângela Soares de Azevedo, César Luiz Guimarães e seu grupo de pesquisa pela preparação do extrato da *Humirianthera ampla*.

Aos meus sobrinhos Gabriel e Luana, por compreenderem a minha ausência, amo vocês.

Aos meus irmãos, Silvano, Cristiano e Cristina, e minha cunhada Cátia, pelo apoio e carinho.

A Vó Maria, por compreender a demora das minhas visitas.

Ao meu namorado Allisson, por compreender os momentos difíceis e ao meu lado, ajudar a superá-los.

---

Aos professores do departamento de Bioquímica e Fisiologia, Prof<sup>a</sup>. Ana Lúcia, Prof. Alcir e Prof. Marcelo pela contribuição neste trabalho.

Aos professores da Pós-graduação em Neurociências, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e da Pós-graduação em Neurociências da UFSC, em especial ao secretário da pós-graduação Nivaldo, pela paciência e solicitude com que resolve todos os nossos problemas.

Aos colegas de laboratório, Flávia, Janaina, Rodrigo, Gisele e Diana que tornaram possível a execução de algumas técnicas para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Rodrigo, Diana e Marina, pelos experimentos realizados, pela amizade e por contribuírem para a minha formação profissional.

A minha segunda família, “pessoal do lab”, são tantos nomes que poderia esquecer de alguém. Agradeço pelo companheirismo e pela amizade, gosto muito de todos vocês.

Aos meus amigos sempre presentes, em especial a Gi, Vivi, Gica, Grazi, Carina e Tati, pelo apoio nas horas difíceis e companheirismos nos momentos de alegria.

Aos amigos, Carlos Eduardo e Rodrigo, pelos momentos de convívio e pelos jantares.

Aos colegas e amigos, Vini, Ney, Fábio “Gaúcho”, Vanessa, Camila, Liana, Igor e Fabi, foi uma alegria conhecer vocês durante esta jornada.

A CAPES, CNPq, PRONEX, FAPESC e UFSC pelo suporte financeiro.

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Dor.....	1
1.1.1. Dor neuropática.....	12
1.2. Produtos naturais.....	14
1.3. <i>Humirianthera ampla</i> Miers.....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Material botânico.....	19
3.3. Drogas.....	20
3.4. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	21
3.5. Nocicepção induzida pela formalina.....	22
3.6. Nocicepção induzida pela capsaicina.....	22
3.7. Nocicepção térmica induzida por calor radiante – “Teste de retirada da cauda”.....	23

---

3.8. Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático.....	23
3.9. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE da <i>H. ampla</i> .....	24
3.9.1. Envolvimento dos agonistas glutamatérgicos e da substância P.....	25
3.9.2. Envolvimento do sistema opióide.....	26
3.9.3. Envolvimento do sistema adenosinérgico.....	27
3.9.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	27
3.9.5. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	27
3.10. Esquiva inibitória.....	28
3.11. Avaliação do desempenho e atividade locomotora.....	29
3.12. Análise estatística.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. Nocicepção induzida pelo glutamato.....	31
4.2. Nocicepção induzida pela formalina.....	32
4.3. Nocicepção induzida pela capsaicina.....	33
4.4. Nocicepção térmica induzida por calor radiante – “Teste de retirada da cauda”.....	33
4.5. Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático.....	34
4.6. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE da <i>H. ampla</i> .....	37
4.6.1. Envolvimento dos agonistas glutamatérgicos e da substância P.....	37
4.6.2. Envolvimento do sistema opióide.....	38
4.6.3. Envolvimento do sistema adenosinérgico.....	39
4.6.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	40
4.6.5. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	41
4.7. Esquiva inibitória.....	42
4.8. Avaliação do desempenho e atividade locomotora.....	43

---

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>μmol</b>	Micromol
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPA</b>	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de 3'5' -adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>Cainato</b>	Ácido caínico
<b>CaMKII</b>	Cálcio calmodulina quinase II
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose que inibe a resposta em 50%
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>EE</b>	Extrato etanólico
<b>eNOS</b>	Sintase de óxido nítrico endotelial
<b>GABA</b>	Ácido γ-amino butírico
<b>GC</b>	Guanilato ciclase
<b>GMP<sub>c</sub></b>	Monofosfato cíclico de 3'5' - guanosina
<b>GNDF</b>	Fator neurotrófico derivado da glia
<b><i>H. ampla</i></b>	<i>Humirianthera ampla</i>

<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	Intraplantar
<b>i.t.</b>	Intratecal
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>iNOS</b>	Sintase de óxido nítrico induzida
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>L-NOARG</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
<b>LTM</b>	Memória de longa duração
<b>LTP</b>	Potencial de longa duração
<b>mA</b>	Mili Ampere
<b>mGluR</b>	Receptor glutamatérgico metabotrópico
<b>MK-801</b>	Maleato de dizocilpina
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NAL</b>	Cloridrato de naloxona
<b>NAL-M</b>	Naloxona metiodida
<b>NGF</b>	Fator de crescimento do nervo
<b>NK</b>	Neurocinina
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>nmol</b>	Nanomol
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase de óxido nítrico
<b>P2X<sub>3</sub></b>	Subtipo de receptor purinérgico X <sub>3</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>

<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>pmol</b>	Picomol
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>s.c</b>	Subcutânea
<b>SP</b>	Substância P
<b>STM</b>	Memória de curta duração
<b>trans-ACPD</b>	Ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
<b>trkA</b>	Receptor de tirosina quinase A
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UNIR</b>	Universidade Federal de Rondônia
<b>v.o.</b>	Via oral

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Partes aéreas da <i>Humirinathera ampla</i> (A) e seu tubérculo (B). .....	17
<b>Figura 2</b> – Avaliação do efeito antinociceptivo dependente da dose (3-300 mg/kg, v.o., A) e dependente do tempo (30 mg/kg, v.o., B) do EE da <i>H. ampla</i> na nocicepção induzida por glutamato (10 µmol/pata) em camundongos. ....	31
<b>Figura 3</b> – Efeito antinociceptivo do EE da <i>H. ampla</i> (30-500 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos.....	32
<b>Figura 4</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (3-300 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por capsaicina (1,6 µg/pata) em camundongos..	33
<b>Figura 5</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg v.o.) na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP em camundongos. ....	34
<b>Figura 6</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (10-100 mg/kg, v.o.) na nocicepção térmica induzida por calor radiante em camundongos.....	35
<b>Figura 7</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos...	36
<b>Figura 8</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) 2 (A) e 24 (B) horas após o tratamento diário na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	37
<b>Figura 9</b> – Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. ....	38

<b>Figura 10</b> – Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	39
<b>Figura 11</b> – Efeito do pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	40
<b>Figura 12</b> – Efeito do pré-tratamento dos animais com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.), cetanserina (1 mg/kg, i.p.) ou ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	41
<b>Figura 13</b> – Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (40 mg/kg i.p.) ou D-arginina (40 mg/kg i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) e L-NOARG (25 mg/kg, i.p.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. ....	42
<b>Figura 14</b> – Efeito do EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.) sobre a aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta (STM, A e C) e longa duração (LTM, B e D) no modelo de esQUIVA inibitória em ratas. ....	43
<b>Figura 15</b> – Prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do EE da <i>H. ampla</i> . ....	59

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Efeito do EE da *H. ampla* sobre a performance motora (“rota-rod”) e atividade locomotora (campo aberto) de camundongos..... 43

---

---

**RESUMO**

O presente estudo investigou a possível ação antinociceptiva do extrato etanólico (EE) obtido das raízes da *Humirianthera ampla* (*H. ampla*) em modelos de nocicepção química, mecânica e térmica em camundongos. O EE (3-300 mg/kg) administrado pela via oral (v.o.), 1 h antes do teste, produziu inibição significativa da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato e capsaicina, com  $DI_{50}$  de 19,8 (15,6-25,2) e 20,0 (17,4-23,0) mg/kg, respectivamente. Da mesma forma, o EE (30-500 mg/kg, v.o.) também causou inibição significativa da nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela formalina. O EE (30 mg/kg), administrado pela via oral 1 h antes do teste, causou marcante inibição da resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal (i.t.) de glutamato, trans-ACPD, NMDA e substância P (com inibições de  $84\pm 2$ ,  $41\pm 10$ ,  $55\pm 8$  e  $53\pm 9\%$ , respectivamente), sem afetar a nocicepção induzida pelo AMPA ou cainato. O EE (30 mg/kg) também reduziu a alodínia mecânica, avaliada através de filamentos de Von Frey, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático, com inibição de  $94\pm 8\%$ . Porém, o EE (10-100 mg/kg, v.o.) não produziu aumento significativo na latência dos animais no teste de retirada da cauda. O efeito antinociceptivo do EE (30 mg/kg, v.o.) na nocicepção causada pelo glutamato foi significativamente atenuado pela injeção intraperitoneal (i.p.) de naloxona (1 mg/kg), L-arginina (40 mg/kg), cetanserina (1 mg/kg), ondansetrona (0,5 mg/kg) ou WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.), mas não pela cafeína (3 mg/kg, i.p.) ou naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c.). A antinocicepção causada pelo EE não está associada a efeitos inespecíficos, como relaxamento muscular ou sedação. Além disso, o EE não

foi capaz de causar alteração na formação da memória, quando analisado no modelo de esquiva inibitória. Em conjunto, estes resultados sugerem que o EE da *H. ampla* apresenta importante atividade antinociceptiva em vários modelos experimentais de nocicepção em camundongos. O seu mecanismo de ação antinociceptiva não está completamente esclarecido, mas o presente estudo mostrou que esta ação é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os sistemas opióide, serotoninérgico, glutamatérgico e com a via L-arginina-óxido nítrico.

## ABSTRACT

The present study investigated the possible antinociceptive actions of the ethanolic extract (EE) obtained from roots of *Humirianthera ampla* (*H. ampla*) in chemical, mechanical and thermal behavioural models of pain in mice. The EE (3-300 mg/kg), given orally (p.o.), 1 h prior to testing, produced dose-dependent inhibition of glutamate- and capsaicin-induced hindpaw licking responses, with ID<sub>50</sub> values of 19.8 and 20.0 mg/kg, respectively. Moreover, the EE (30-500 mg/kg, p.o.) also caused significant inhibition of both neurogenic (early phase) and inflammatory (late phase) pain of formalin-induced licking. The EE (30 mg/kg, p.o., 1h prior to testing) caused marked inhibition of the nociceptive response induced by intrathecal (i.t.) administration of glutamate, trans-ACPD, NMDA and substance P (by 84±2, 41±10, 55±8 and 53±9%, respectively), without affecting nociceptive responses induced by AMPA or kainate. The EE (30 mg/kg, p.o.) also reduced the mechanical allodynia, evaluated by von Frey monofilament fibers, induced by partial sciatic nerve injury neuropathy, with inhibition of 94±8%. However, the EE (10-100 mg/kg, p.o.) failed to increase the latency response in the tail-flick test. The antinociception caused by EE (30 mg/kg, p.o.) in the glutamate test was significantly attenuated by i.p. treatment of mice with naloxone (1 mg/kg), L-arginine (40 mg/kg), ondansetron (0.5 mg/kg), ketanserin (1 mg/kg) or WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.). In contrast, EE (30 mg/kg, p.o.) antinociception was not affected by caffeine (3 mg/kg, i.p.) or by naloxone methiodide (1 mg/kg, s.c.). The antinociception caused by EE was not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or sedation. Moreover, the EE did not impair memory processes in rats submitted to the

inhibitory avoidance task. Together, these results provide experimental evidences indicating that EE of *H. ampla* roots produces dose-related antinociception in several experimental models of nociception in mice, through mechanisms that involve an interaction with the L-arginine-nitric oxide pathway and opioid, serotonergic and glutamatergic systems.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Dor**

A sensação de dor tem um papel fisiológico importante, funcionando como um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que ameace a integridade física do organismo (CHAPMAN e GAVRIN, 1999). Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante de precaução e, conseqüentemente, limitação de possíveis danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA et al., 2004), sendo esta a reação mais comum entre os indivíduos que procuram atendimento médico. Porém, a dor quando persistente provoca reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (CHAPMAN e GAVRIN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; GRIFFIS et al., 2006).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (JULIUS e BASBAUM, 2001). A dor existe tanto como um evento sensorial do sistema nervoso periférico e central quanto como uma profunda experiência fenomenológica que afeta os processos de consciência e, portanto, a expressão e definição “particular” durante a dor (GIORDANO, 2005). Dentre os transtornos que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia (resposta nociceptiva para estímulos nocivos) e a alodínia (resposta nociceptiva aumentada para estímulos não nocivos) (MILLAN, 1999).

No início do século vinte foi introduzido o termo nocicepção (do latim *Nocere*, “lesar”); fato importante uma vez que em modelos animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental. O termo nocicepção refere-se apenas a parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. Dessa forma, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção (TJØLSEN e HOLE, 1997).

A percepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas das fibras sensoriais, denominadas nociceptores (ou receptores da dor). Eles são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, sendo sensíveis a estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos (JULIUS e BASBAUM, 2001). Todas as fibras nociceptivas sensoriais primárias fazem conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo que através de neurônios terciários, enviam o sinal ao córtex cerebral (MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004). A informação nociceptiva é transmitida por vários tratos, sendo os mais importantes os espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG e DOSTROVSKY, 1999). Na região do pescoço e cabeça os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios de segunda ordem nos núcleos sensoriais do tronco cerebral, que em seguida, conduzem as informações nociceptivas para diferentes núcleos talâmicos (DOSTROVSKY, 2000).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. A dor aguda corresponde à ativação local de nociceptores induzida por um dano tecidual, sendo que a dor desaparece até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Já a dor crônica provocada por uma lesão tecidual ou doença, geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, sendo um importante fator de incapacidade e sofrimento (LOESER e MELZACK, 1999; LOTSCH e GEISLINGER, 2001).

Na percepção da dor os neurônios aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos. Os que possuem fibras mais mielinizadas, de maior diâmetro (10  $\mu\text{m}$ ) e que apresentam maior velocidade (30-100 m/s) de condução caracterizam as fibras A $\beta$ . Contudo, a maioria dos nociceptores está incluso nas fibras de pequeno (0,4-1,2  $\mu\text{m}$ ) e médio diâmetro (2-6  $\mu\text{m}$ ) que constituem respectivamente as fibras C, não mielinizadas, e as fibras A $\delta$ , pouco mielinizadas (PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). A maioria das fibras C responde a estímulos térmicos, químicos e mecânicos, sendo por isso, denominados de nociceptores polimodais. Elas podem ser divididas em dois grupos de neurônios: os que sintetizam peptídeos como substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor tirosina quinase A (trkA) de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF); e os que expressam receptores para as purinas (P2X<sub>3</sub>), sítio de ligação para isolectina B4 e os receptores para o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF) (HUNT e MANTYH, 2001; SAWYNOKA e LIU, 2003). As fibras A $\delta$ , por sua vez, conhecidas como nociceptores mecanotérmicos, são responsivas às estimulações nociceptivas mecânicas e térmicas (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Já as fibras A $\beta$ , numa proporção substancial nos neurônios aferentes sensoriais da pele, músculos, articulações e tendões, geralmente são unimodais e respondem aos estímulos de baixa e alta intensidade e raramente constituem nociceptores em condições normais (JULIUS e BASBAUM, 2001; DJOUHRI e LAWSON, 2004).

O corno dorsal da medula espinhal está dotado de vários neurotransmissores incluindo: substância P, somatostatina, neuropeptídeo Y, aminoácidos excitatórios, aminoácidos inibitórios, óxido nítrico, opióides, adenosina, serotonina, monoaminas, entre outros. Indubitavelmente, esta complexidade dificulta a descoberta dos potenciais mecanismos pelos quais se pode inibir a dor sem causar efeitos colaterais (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

O principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores é o glutamato, embora as fibras sejam também sensibilizadas por outras substâncias químicas endógenas liberadas no ambiente tecidual em condições anormais. Dentre elas destacam-se a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, neuropeptídeo Y, purinas, íons K<sup>+</sup>, prostaglandinas, tromboxano, citocinas (interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa) e prótons (H<sup>+</sup>). Neste sentido, grande parte da ativação das fibras nociceptivas se dá por receptores específicos acoplados à cascata de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. Dentre estes receptores podemos citar o receptor vanilóide, denominado de Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1), é expresso por um subgrupo de neurônios periféricos, tornando-os sensíveis a vários estímulos dolorosos

incluindo prótons, calor, mediadores lipídeos e compostos vanilóides como a capsaicina (CATERINA et al., 1997).

A modulação e integração descendente da informação nociceptiva é processada pelas vias descendentes que se originam no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002). A modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, e sistemas de neurotransmissores dentre os quais podem ser mencionados os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, glutamatérgico, além dos canabinóides endógenos, entre outras substâncias (MILLAN, 2002).

Na medula rostroventromedial estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células-*on* e células-*off*, as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva (FIELDS e BASBAUM 1999). Postulou-se que as células-*off* exercem inibição da nocicepção nas vias descendentes, uma vez que há uma inibição da transmissão nociceptiva quando sua atividade está aumentada. Por outro lado, as propriedades das células-*on* tornam-se incompatíveis com o conceito de sistema inibitório descendente, uma vez que parecem facilitar os mecanismos nociceptivos no corno dorsal quando estão ativas (FIELDS e BASBAUM, 1999). De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve

excitar as células-*off* e inibir as células-*on* na medula rostroventromedial (FIELDS et al., 1991; MARTINS, 2005).

Grandes evidências indicam que os aminoácidos, principalmente o glutamato, que é encontrado primariamente nas fibras C, apresentam um papel fundamental na transmissão da informação nociceptiva da medula espinhal até estruturas centrais (MILLAN, 1999; BLEAKMAN, et al, 2006). Existem dois grupos distintos de receptores glutamatérgicos denominados ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) são canais iônicos permeáveis ao cálcio, sódio e potássio (DICKENSON, 1997). Dados da literatura demonstram que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos do subtipo NMDA, são formados por diferentes subunidades e encontram-se amplamente distribuídos no sistema nervoso central (YAMAKURA e SHIMOJI, 1999; MARVIZON et al., 2002; BLEAKMAN, et al, 2006). Os receptores cainato são amplamente distribuídos no sistema nervoso central, incluindo o corno dorsal da medula espinhal, principalmente nas fibras de pequeno e médio diâmetro (PALECEK et al., 2004). De fato, aproximadamente 60–70% dos receptores de cainato expressos no gânglio dorsal da medula espinhal estão co-expressos com receptores TRPV1, sugerindo sua participação na percepção dolorosa. Além disso, dados da literatura demonstram que receptores cainato podem modular a liberação de GABA de neurônios inibitórios (BLEAKMAN et al., 2006). Já o aumento de receptores AMPA na membrana sináptica e mudanças em seu estado de fosforilação em condições dolorosas sugerem o seu potencial papel na sinalização patológica da dor e o potencial benefício de antagonistas de receptores AMPA no tratamento de

dores crônicas (BLEAKMAN et al., 2006). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos ( $mGluR$ ) dividem-se em oito subtipos classificados em três subgrupos de acordo com a sua homologia e mecanismo de transdução de sinal: o grupo I ( $mGluR$  1 e 5) promove ativação da via da fosfolipase C; o grupo II ( $mGluR$  2 e 3) e o grupo III ( $mGluR$  4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente a adenilato ciclase (OZAWA et al., 1998; GURPREET e STEPHEN, 2006).

Já é bem descrito na literatura que antagonistas de receptores glutamatérgicos (ionotrópicos e metabotrópicos) produzem déficit de memória no modelo de esQUIVA inibitória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; VINADÉ et al., 2004). Nesse sentido, tendo em vista que o sistema glutamatérgico participa ativamente da formação de memória, assim como dos mecanismos de percepção da dor, a pesquisa por novas drogas analgésicas que atuem sobre este sistema deve levar em consideração o déficit cognitivo como provável efeito adverso.

Além do glutamato que participa ativamente como neurotransmissor na percepção dolorosa, podemos citar a substância P (SP), um neuropeptídeo amplamente distribuído no organismo. Recentemente, receptores da SP (principalmente o subtipo  $NK_1$ ) foram observados não somente em neurônios e células imunes como também em outras células periféricas, incluindo células ósseas (GOTO et al., 2007). Porém, é no sistema nervoso central e periférico que a SP atua como neurotransmissor das mensagens nociceptivas. Este neuropeptídeo é sintetizado pelos neurônios do gânglio da raiz dorsal e liberado nas fibras do tipo C em resposta a agressões ou a estimulações intensas dos nervos periféricos (BASBAUM e JESSELL, 2000; GOTO et al., 2007). Ela atua sobre os receptores de neurocininas ( $NK_1$ ,  $NK_2$  e  $NK_3$ ),

preferencialmente no subtipo de receptor  $NK_1$ . Diversos estudos indicam interação entre a SP e o glutamato na medula espinhal (BENOLIEL et al., 2000; RIEDEL e NEECK, 2001), sendo que ambos estão implicados na manutenção da transmissão nociceptiva, através da formação do fenômeno “wind up”, que ocorre em condições de dor persistente (HERRERO et al, 2000). Dados da literatura demonstram que receptores NMDA pré-sinápticos localizados nas terminações de fibras C facilitam e prolongam a transmissão da mensagem nociceptiva, através da liberação de SP e glutamato (MALCANGIO et al., 1998; SAKURADA et al., 2002).

Outro mediador nociceptivo é o óxido nítrico (NO), um importante mensageiro biológico, que medeia alguns efeitos dos aminoácidos excitatórios e receptores NMDA. Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC) solúvel, tida como seu receptor fisiológico, que por sua vez converte a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases da classe G, canais iônicos e diminuir a ativação das fosfodiesterases (MOORE et al., 1991). Existem três isoformas da sintase de óxido nítrico (NOS): neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS). As enzimas nNOS e eNOS são constitutivas, enquanto a expressão da iNOS é induzida por vários estímulos. Contrariamente às NOS constitutivas, que dependem do  $Ca^{2+}$ , a atividade da iNOS não depende do influxo de cálcio na célula e é induzida por estímulos inflamatórios. Tem sido registrado que o NO é produzido pós-sinápticamente em resposta à ativação de aminoácidos excitatórios, e que inibidores da NOS podem inibir indiretamente os receptores NMDA (GARTHWAITE, 1991; OZEK et al., 2003). A produção de NO a partir da L-arginina, que é catalisada pela

nNOS, é estimulada por ativação de receptores NMDA que permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). Além disso, tem sido encontrada uma regulação recíproca entre glutamato e NO, sendo assim, o NO e glutamato podem influenciar mutuamente suas taxas de produção e liberação (LIN et al., 2000; OZEK et al., 2003).

Já os opióides endógenos induzem analgesia por atuarem sobre a substância cinzenta periaquedutal e outras estruturas, como a medula rostroventromedial e o corno dorsal da medula espinhal. Os opióides regulam a transmissão nociceptiva, em parte, pela inibição da liberação dos neurotransmissores envolvidos na resposta dolorosa. Essa inibição ocorre também devido à ativação dos canais de potássio e à inibição de canais de cálcio dependente de voltagem (MILLAN, 1999). Periféricamente, tem sido proposto que agonistas de receptores  $\mu$ -opióides atuam inibindo a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários, enquanto agonistas de receptores  $\delta$  e  $\kappa$  opióides inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (TAIWO e LEVINE, 1991; KIM et al., 2006).

A adenosina é uma purina, formada intra e extracelularmente a partir do ATP por ação das enzimas 5'-endonucleotidase e 5'-ectonucleotidase, respectivamente. Uma outra fonte intracelular de adenosina é a S-adenosil-homocisteína, pela ação da enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase. Na sua metabolização, a adenosina é convertida a ATP pelo passo inicial dependente da enzima adenosina quinase e a inosina, sob ação da enzima adenosina deaminase (SEGERDHAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1999; SAWYNOK e LIU, 2003). A modulação das concentrações de adenosina extracelular, por inibidores do metabolismo de adenosina, pode produzir efeitos antinociceptivos

e antiinflamatórios, dentre outros (SAWYNOK, 1999; MILLAM, 2002). Entretanto, a adenosina não é enquadrada como verdadeiro neurotransmissor, mas sim como um neuromodulador, tendo em vista que não há evidências de seu armazenamento vesicular, nem de uma liberação cálcio dependente em resposta à estimulação nervosa, seja no sistema nervoso central ou no periférico (SEGERDHAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1999; SAWYNOK e LIU, 2003).

Até o momento quatro receptores de adenosina todos acoplados a proteína G, foram clonados e identificados como: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Os receptores A<sub>1</sub> estão localizados no sistema nervoso central e interagem com a proteína G<sub>i/o</sub>, levando à inibição da adenilato ciclase, o que pode facilitar a abertura de canais de K<sup>+</sup> e a inibição de correntes de Ca<sup>2+</sup>. Os receptores A<sub>3</sub> também atuam inibindo a adenilato ciclase via proteína G<sub>i/o</sub>, mas o seu papel na modulação do processo nociceptivo não é bem compreendido. Já os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> estão acoplados à proteínas G<sub>s</sub> e G<sub>q</sub> respectivamente, estimulando a adenilato ciclase. O padrão oposto de acoplamento de sítio de receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> à adenilato ciclase e também a diferença na modificação da excitabilidade celular, sugerem que eles modificam o processo nociceptivo por mecanismos neuronais distintos (CUNHA, 2001; KLINGER et al., 2002; SAWYNOK e LIU, 2003).

A serotonina (5HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina envolvida na estimulação das vias descendentes de controle da dor. Estudos têm demonstrado que a estimulação de áreas relacionadas à analgesia está associada à elevação dos níveis de serotonina (BASBAUM, 1981). Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no sistema nervoso central originam-

se dos núcleos da rafe, os quais representam uma rica fonte de serotonina neuronal em mamíferos (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS et al., 1996), bem como na modulação da dor (MILLAN, 2002). E o núcleo magno da rafe é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante na modulação do controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de 5-HT são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (CARTER e SULLIVAN, 2002; MILLAN, 2002).

Várias evidências sugerem que os subtipos de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> modulam a transmissão nociceptiva. A ativação destes receptores na medula espinhal produz antinocicepção no teste da formalina e em outros modelos de nocicepção (BARDIN et al., 2000; MILLAN, 2002). Os distintos subtipos de receptores 5-HT presentes na medula espinhal parecem exercer diferentes funções no controle da nocicepção, resultado dos diferentes mecanismos de transdução de sinal pelos quais cada receptor atua (BARDIN et al., 2000). Dessa forma, a atividade dos receptores de 5-HT é complexa e muitas vezes contraditória. Vários fatores podem influenciar sua resposta, dentre eles podemos citar: o subtipo de receptor ativado; a contribuição de ação pré ou pós-sináptica do receptor; o estímulo nociceptivo em termos de qualidade e intensidade; e o efeito da dose, que pode ser antinociceptiva ou não, dependendo do subtipo de receptor 5-HT que o agonista ou antagonista irá atuar (HYLDEN e WILCOX, 1983; MILLAN, 2002).

### **1.1.1. Dor neuropática**

A dor neuropática é uma dor crônica causada como consequência direta de alguma lesão ou doença de parte do sistema nervoso (BARON, 2006). A principal sintomatologia clínica das neuropatias periféricas inclui dor espontânea ou hipersensibilidade da área afetada, levando à hiperalgesia ou alodinia (FINNERUP e JENSEN, 2004), que ocorrem principalmente devido às alterações ocorridas na medula espinhal (CODERRE et al., 1993; JI e WOOLF, 2001; WOOLF e SALTER, 2000). Em algumas situações, a dor neuropática pode estender-se além dos limites dos nervos lesados, manifestando-se bilateralmente, o que sugere alterações nos mecanismos centrais de processamento da informação nociceptiva (CODERRE et al., 1993).

Um dos mecanismos que pode contribuir para a alodínia mecânica está relacionado à perda de neurônios, principalmente as fibras do tipo C, devido a sua compressão. Com isso, as fibras A $\beta$ , que normalmente terminam na lâmina III do corno dorsal, passam então a brotar para as lâminas mais superficiais da medula (I e II), ocupando os espaços anteriormente ocupados pelas terminações centrais das fibras C. Desta forma são formadas novas sinapses entre fibras A $\beta$  e neurônios nociceptivos secundários que normalmente respondem a estímulos nocivos (WOOLF et al., 1995; LEKAN et al., 1996; TANDRUP et al., 2000).

Já a hipersensibilidade ocorre em função de uma estimulação repetitiva sobre as fibras do tipo C, o que resulta em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Este fenômeno é conhecido como “wind up” (DAVIES e LODGE, 1987; HERRERO et al., 2000) e significa um aumento progressivo no número de potenciais de ação por estímulo que ocorre em

neurônios do corno dorsal. Estes episódios repetitivos de “wind up” podem levar à potenciação a longo prazo (“Long-Term Potentiation”, LTP), a qual envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica (POCKETT, 1995). Um dos fatores que levam ao “wind up” é o aumento na expressão de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina e diminuição na expressão de canais de potássio após a lesão do nervo (WAXMAN et al., 1999; BARON, 2006).

Outra alteração na medula espinhal responsável pela dor crônica é a diminuição da neurotransmissão inibitória, principalmente no que se refere à neurotransmissão GABAérgica (IBUKI et al., 1997; MALAN et al., 2002; WOOLF, 2004). A eficácia reduzida dos opióides endógenos também contribui para a diminuição da inibição da dor (ZHANG et al., 1998).

Na dor neuropática, assim como acontece no processo inflamatório, a ação dos mediadores sobre seus receptores, tanto em nervos periféricos quanto centrais, inicia uma cascata de sinalização que culmina na manutenção do potencial de ação. Dessa forma, o envolvimento das células gliais periféricas na dor neuropática, parece estar relacionado à liberação de mediadores inflamatórios (MOALEM e TRACEY, 2005; BARON, 2006). Por ser uma condição crônica, a principal característica desta patologia é a mudança plástica causada pela alteração na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores e mediadores de sinalização extracelular, entre outros (WOOLF e COSTIGAN, 1999; XIAO et al., 2002; COSTIGAN et al., 2002; JI e STRICHARTZ, 2004).

O tratamento da dor neuropática é um dos mais difíceis entre os diferentes tipos de dor. Geralmente a terapia medicamentosa apresenta reduzida eficácia e/ou seu efeito na maioria dos casos torna-se ineficaz.

Pacientes com dor neuropática geralmente não respondem ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais e são resistentes ou insensíveis aos opióides, embora recentemente exista controvérsia sobre a frequência destas características. Atualmente o tratamento é realizado com a utilização de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptção de serotonina, anticonvulsivantes e capsaicina de uso tópico (creme ou pomada), entre outros. Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou efeitos colaterais (SAWYNOK, 2003; UEDA, 2006). Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa de novos agentes que sejam eficazes no tratamento da dor neuropática.

## **1.2. Produtos Naturais**

Desde a antiguidade, os produtos naturais, notavelmente os derivados de plantas, têm consistentemente sido uma importante fonte de agentes terapêuticos, sendo que o Brasil possui aproximadamente 20 a 22 % de todas as plantas e microorganismos existentes no mundo. Entretanto, estima-se que não mais do que 10% das espécies de plantas tenham sido objeto de alguma investigação científica (CALIXTO, 2005). Os produtos naturais inicialmente eram utilizados sob a forma “in natura”s como tinturas, chás, emplastro e outras formulações (BALICK e COX, 1997; SAMUELSSON, 2004).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais vêm contribuindo ao longo dos tempos de forma relevante para a divulgação das prováveis ações terapêuticas das plantas, prescritas com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus efeitos cientificamente comprovados. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de

fitoterápicos, tornando a princípio válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Este tipo de cultura medicinal tem despertado o interesse de pesquisadores de diferentes áreas, constituindo um grupo multidisciplinar envolvendo a Botânica, Agronomia, Farmacologia, Fitoquímica, dentre outras, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a importância dos produtos naturais, em especial as plantas medicinais (MACIEL et al., 2002).

A descoberta de plantas medicinais levou ao isolamento de drogas como o quinino da *Cinchona pubescens* Vahl., a morfina e a codeína da *Papaver somniferum* L., a digoxina da *Digitalis lanata* Ehrhart., a atropina (derivado da (-)-hiosciamina) e hioscina de espécies do gênero *Solanaceae* que ainda hoje são muito utilizadas na clínica (PHILLIPSON, 2001). De fato, o grande número de medicamentos que enriquecem a terapêutica moderna com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não tivesse a participação dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas (CALIXTO, 2001). O conjunto de produtos naturais e dos que são derivados ou miméticos de produtos naturais, representam aproximadamente 48% dos novos fármacos registrados de 1981–2002 (NEWMAN et al., 2003).

Nos últimos anos, o interesse por terapias alternativas e o uso de produtos naturais derivados de plantas, pela população, têm aumentado drasticamente. Este interesse justifica-se por se acreditar que os fitoterápicos apresentam menor número de efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas, e por se

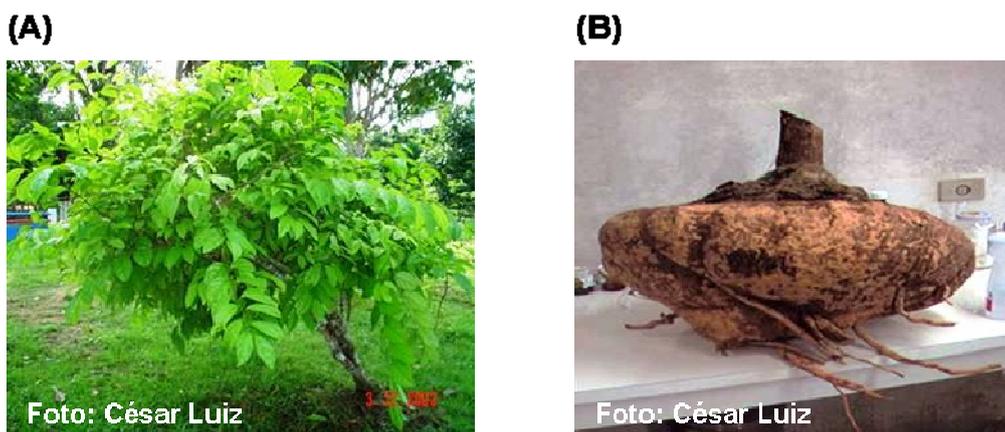
mostrarem aparentemente eficazes em casos onde a medicina tradicional não alcançou o resultado esperado (CALIXTO, 2000).

Para a sociedade dos países em desenvolvimento, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, facilitando ainda o crescimento da fitomedicina nacional e desta forma, apresentando impacto na economia local (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996).

Diante da enorme abundância de plantas com poder curativo, a região Amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, sendo que os estudos dessas plantas vêm se intensificando. Porém, a porcentagem de espécies que foram estudadas e tiveram suas atividades confirmadas como eficientes fitoterápicos é pequena (DI STASI, 1996 ).

### **1.3. *Humirianthera ampla* Miers.**

A *Humirianthera ampla* Miers (*H. ampla*, Fig. 1A) é um membro da família Icacinaceae, presente na Amazônia (HEGNAUER, 1966) e conhecida popularmente como “surucuáína ou surucuína”, devido a seus tubérculos (Fig. 1B), na forma macerada, serem aplicados como anti-ofídicos (GRAEBNER et al., 2000; 2002). A família Icacinaceae inclui 56 gêneros, predominantemente localizados dentro de regiões tropicais e sub-tropicais, sendo que alguns gêneros desta família estendem-se para zonas temperadas (SLEUMER, 1971; GRAEBNER et al., 2000).



**Figura 1.** Partes aéreas de *Humirinathera ampla* (A) e seu tubérculo (B).

Estudos químicos prévios de espécies da família Icacinaceae revelaram que esta família é uma fonte rica em terpenóides (KAPLAN et al., 1991). A partir do extrato etanólico bruto obtido da raiz da *H. ampla* foram isoladas as seguintes substâncias: ftalato, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, sitosterol glicosilado, o já conhecido diterpeno annonalida, além de dois novos denominados acrenol e humirianthol. Este último apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (GRAEBNER et al., 2000). Além disso, estudos sobre a possível atividade antiinflamatória nos modelos farmacológicos de edema de pata de rato induzido por carragenina, dextrana e histamina, avaliação da permeabilidade vascular por histamina e das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos sugerem que o extrato etanólico desta planta apresenta atividade antiinflamatória (LIMA et al., 2000).

Tendo em vista o uso etnofarmacológico da *H. ampla* e considerando suas propriedades farmacológicas, o presente trabalho visa investigar a possível atividade antinociceptiva do extrato etanólico obtido da raiz da *Humirianthera ampla* Miers proveniente de Porto Velho (Rondônia – Brasil), em modelos de nocicepção que utilizam estímulos químicos, térmico e mecânico em camundongos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação antinociceptiva do extrato etanólico (EE) obtido da raiz da *Humirianthera ampla* em modelos de nocicepção que utilizam estímulos químicos, térmico e mecânico em camundongos, assim como avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade antinociceptiva.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a ação antinociceptiva do EE da *H. ampla* em modelos químicos de nocicepção induzida pelo glutamato, formalina e capsaicina em camundongos.
2. Analisar o possível efeito do EE da *H. ampla* sobre a nocicepção térmica no modelo de retirada da cauda em camundongos.
3. Avaliar o possível efeito do EE da *H. ampla* sobre alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático em camundongos.
4. Investigar a possível influência dos sistemas: glutamatérgico, opióide, adenosinérgico, serotoninérgico e com a via L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva do EE da *H. ampla* no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.
5. Analisar o possível efeito do EE da *H. ampla* sobre a memória em ratos, no modelo de esquiva inibitória.
6. Verificar o efeito do EE da *H. ampla* sobre a performance e atividade locomotora de camundongos nos testes do “rota-rod” e campo aberto.

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados nos experimentos camundongos Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-35g e fêmeas de ratos Wistar pesando entre 250–300 g. Os animais permaneciam aclimatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro as 7:00 h), com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) e livre acesso a água e comida. Os camundongos (machos e fêmeas) foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo (n: 23080.0011700/2005-03/UFSC) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguindo as normas éticas para o cuidado dos animais de laboratório e investigação científica da dor em animais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

#### **3.2. Material botânico**

A planta foi coletada no parque ecológico, “Parque Natural de Porto Velho”, Porto Velho - Rondônia, nos pontos 01 (S 08° 41.200`; W 063° 52.022`) e 02 (S 08° 41.157`; W 063° 51.985`). O material botânico coletado foi identificado pelo Sr. José Ferreira Ramos do Departamento de Botânica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em Manaus. Uma amostra da espécie da *Humirianthera ampla* (*H. ampla*) foi depositada no herbário do

INPA sob o número 214579. A obtenção do extrato etanólico da *H. ampla* foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariângela Soares de Azevedo do Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia. As raízes da *H. ampla* coletadas foram picadas em cubos a fim de iniciar o processo de secagem em estufa com circulação mecânica por um período 7 dias à 60°C (FALKENBERG et al., in SIMÕES, 1999). Para obtenção do extrato etanólico optou-se pelas duas formas descritas a seguir:

1. Raízes secas em cubos (589,23g) foram colocadas em contato com etanol 95% (2L) por 7 dias (SIMÕES et al., 1999), obtendo-se 9,86 g de extrato etanólico. O procedimento foi repetido por duas vezes.
2. Raízes secas e moídas (500g), previamente foram particuladas em moinho manual e posteriormente moída em moinho de elétrico, em seguida colocada em etanol 95% (2L) por 7 dias (SIMÕES et al., 1999), obtendo-se 14,532g de extrato etanólico. O procedimento foi repetido por duas vezes.

O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o extrato concentrado e estocado no freezer a -20 °C até o uso.

### **3.3. Drogas**

As seguintes substâncias foram utilizadas: formalina e cloridrato de morfina (Merck, Darmstadt, Alemanha); capsaicina, ácido glutâmico, cloridrato de naloxona, naloxona metiodida, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), cloridrato de L-arginina, cloridrato de D-arginina, cafeína e WAY100635 (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA); ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido caínico (cainato), substância P (SP), tartarato de cetanserina (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA); cloridrato de ondansetrona (Cristália, São Paulo, Brasil); cloreto de sódio (LabSynth, Diadema, Brasil). O extrato etanólico foi isolado das raízes da *H. ampla* no Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), como descrito acima. As drogas foram dissolvidas em solução 0,9% de NaCl, com exceção da capsaicina, que foi dissolvida em 10% etanol, 10% tween 80 e 80% salina. No entanto, a concentração final de etanol não excedeu 5%, não causando assim quaisquer efeitos “*per se*”.

#### **3.4. Nociceção induzida pelo glutamato**

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nociceção e da antinociceção, tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL e NEECK, 2001). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de glutamato (10 µmol/pata) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, que foi observado por 15 min logo após a injeção. O tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nociceção. Os animais foram tratados com o EE da *H. ampla* (3–300 mg/kg) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg) pela via oral (v.o.) 1 h antes da injeção de glutamato.

Em outro experimento, utilizando o mesmo modelo experimental, foi avaliada a duração da atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg) administrado pela via oral em diferentes tempos (1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas),

previamente à administração de glutamato. Os animais controle receberam salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.).

### **3.5. Nocicepção induzida pela formalina**

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR e HOLE, 1987, TJØLSEN et al., 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente à mesma descrita por SANTOS e CALIXTO (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado 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. Os animais receberam o EE da *H. ampla* (30-500 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes da administração da formalina.

### **3.6. Nocicepção induzida pela capsaicina**

Para evidenciar de forma mais direta o possível efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla* sobre a nocicepção neurogênica, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pela capsaicina. O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por SANTOS e CALIXTO (1997). Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 µL de capsaicina (1,6 µg/pata) foi injetado na superfície ventral da pata direita, sendo

individualmente observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada durante o período de 5 min após a injeção de capsaicina. Os animais receberam o EE da *H. ampla* (3-300 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes da administração da capsaicina.

### **3.7. Nociceção térmica induzida por calor radiante – “Teste de retirada da cauda”**

A fim de verificar a ação antinociceptiva do EE da *H. ampla* na nociceção térmica, os animais foram submetidos ao modelo de retirada da cauda induzida por calor radiante, como descrito previamente por D'AMOUR e SMITH (1941), com pequenas modificações. Os animais utilizados foram selecionados 24 horas antes do experimento com base no limiar de resposta ao teste. No dia do experimento, os animais selecionados foram aclimatizados e depois de contidos colocados no aparelho de retirada da cauda de forma que a cauda ficasse posicionada em cima de uma fotocélula. O efeito antinociceptivo foi registrado como o aumento na latência de retirada da cauda depois de ligada à fonte de calor. Os animais receberam EE da *H. ampla* (10-100 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes do teste. Para evitar dano à cauda do animal foi estabelecido o teto máximo de 30 s.

### **3.8. Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático**

O possível efeito do EE da *H. ampla* sobre a dor neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral (7%, i.p.) e após a verificação da anestesia, foi realizada uma 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 e 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).

A dor neuropática foi avaliada do 7º ao 17º dia após a ligadura do nervo ciático com o filamento de Von Frey (0,6 g). O método consiste na aplicação do filamento sob a região plantar da pata que sofreu a constrição. A resposta nociceptiva foi expressa como a porcentagem de retirada da pata a 10 estímulos induzidos pelo filamento de Von Frey, com intervalos de 1 min entre cada aplicação. No 7º dia os animais foram avaliados 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h após a administração do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.), e nos dias subsequentes a avaliação foi realizada apenas 2 e 24 h após o tratamento, sendo que no 11º e 12º dia todos os grupos receberam apenas salina. Dois grupos de animais: um operado e outro que passou pelo procedimento cirúrgico sem sofrer a constrição (grupo falso operado ou sham), receberam apenas salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) e foram utilizados como parâmetro de comparação ao grupo operado e tratado com o EE da *H. ampla*.

### **3.9. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE da *H. ampla***

A fim de avaliar alguns dos possíveis mecanismos de ação pelo qual o EE da *H. ampla* exerce seu efeito antinociceptivo na nocicepção induzida pelo glutamato, os animais foram tratados com diferentes drogas. As doses das

drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura (SANTOS et al., 1999, 2005; KASTER et al., 2005; GADOTTI et al., 2006; MEOTTI et al., 2006; PIETROVSKI et al., 2006) e dados obtidos previamente em nosso laboratório.

### **3.9.1. Envolvimento dos agonistas glutamatérgicos e da substância P**

Com o intuito de evidenciar se a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) depende da estimulação do sistema nervoso central, aminoácidos excitatórios e substância P (SP) foram administrados intratecalmente. O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por SCHEIDT et al. (2002) e GADOTTI et al. (2006). Os animais receberam uma injeção intratecal de 5 µL dos aminoácidos excitatórios ou SP. As administrações foram realizadas com o animal acordado, utilizando o método descrito por HYLLEN e WILCOX (1980). Os animais foram contidos manualmente, e uma agulha (30) adaptada a uma microseringa de 25 µL (Hamilton) foi inserida entre as vértebras L5-L6 dentro do espaço subdural. As injeções foram administradas durante o período de 5 segundos, e a resposta nociceptiva foi avaliada após a administração de glutamato (agonista não seletivo dos receptores glutamatérgicos, 175 nmol/sítio), AMPA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA, 135 pmol/sítio), NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA, 450 pmol/sítio), Cainato (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo Cainato, 110 pmol/sítio), trans-ACPD (agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II, 50 nmol/sítio) e SP (agonista preferencial de receptores NK<sub>1</sub>, 100

pmol/sítio). O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas posteriores, abdômen ou cauda foi cronometrado e registrado como indicativo de nocicepção. Neste modelo, uma mordida é definida como um simples movimento da cabeça em direção ao abdômen ou membros posteriores, resultando no contato do focinho do animal com o órgão alvo. O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado de acordo com o tempo padronizado para cada agonista: glutamato: 3 min; AMPA: 1 min; NMDA: 5 min; Cainato: 4 min; trans-ACPD: 15 min; SP: 6 min (URCA e RAIGORODSKY, 1988; BOXALL et al., 1998; SCHEIDT et al., 2002).

### **3.9.2. Envolvimento do sistema opióide**

A fim de avaliar a possível participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla*, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.), naloxona metiodida (antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica, 1 mg/kg, s.c.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, i.p.) e após 20 min os animais receberam EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 2,5 mg/kg, s.c.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.). A resposta nociceptiva ao glutamato (i.pl.) foi avaliada 60, 30 e 60 min após a administração do EE da *H. ampla*, morfina ou salina, respectivamente.

### **3.9.3. Envolvimento do sistema adenosinérgico**

A investigação do papel do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo causado pelo EE da *H. ampla*, foi realizada pelo pré-tratamento dos animais com cafeína (antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, 3 mg/kg, i.p.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, i.p.), e após 20 min os animais receberam EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.). A resposta nociceptiva ao glutamato (i.pl.) foi avaliada 60 min após a administração do EE da *H. ampla* ou salina.

### **3.9.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico**

A fim de evidenciar a participação do sistema serotoninérgico sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla*, os animais foram pré-tratados com WAY100635 (antagonista seletivo do subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 0,1 mg/kg, s.c.), cetanserina (antagonista preferencial do subtipo de receptor 5-HT<sub>2A</sub>, 1 mg/kg, i.p.), ondansetrona (antagonista do subtipo de receptor 5-HT<sub>3</sub>, 0,5 mg/kg, i.p.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, i.p.), 20 min antes da administração do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) ou salina (10 ml/kg, v.o.). A resposta nociceptiva ao glutamato (i.pl.) foi avaliada 60 min após a administração do EE da *H. ampla* ou salina.

### **3.9.5. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico**

Com o objetivo de evidenciar a participação da via do óxido nítrico na ação antinociceptiva do EE da *H. ampla*, os animais foram pré-tratados com L-arginina (precursor da síntese do óxido nítrico, 40 mg/kg, i.p.), D-arginina (isômero inativo da L-arginina, 40 mg/kg, i.p.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg,

i.p.), 20 min antes da administração do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.), L-NOARG (inibidor da síntese do óxido nítrico, 25 mg/kg, i.p.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.). O efeito nociceptivo do glutamato (i.pl.) foi registrado 60, 30 e 60 min após a administração do EE da *H. ampla*, L-NOARG ou salina, respectivamente.

### **3.10. Esquiva inibitória**

Com o intuito de investigar a possível ação do EE da *H.ampla* no processo de formação de memória, o modelo da esquiva inibitória foi realizado em ratas, pois este modelo permite avaliar processos de aprendizagem e memória, tarefas essas que dependem de ativação hipocampal e estão extremamente envolvidas com o sistema glutamatérgico (BERNABEU et al., 1997; BEVILAQUA et al., 2003; CAMMAROTA et al., 2004). O aparelho de esquiva inibitória consiste em uma caixa de vidro e plástico medindo 50 x 25 x 25 cm com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento, e no canto esquerdo apresenta uma série das barras de bronze que constituem o assoalho da caixa. Durante o treino os animais (ratas) foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. Quando o animal desceu da plataforma e colocou as quatro patas na grade ele recebeu um choque de 0.4 mA por 1 s nas patas, sendo imediatamente retirado da caixa de treino. Os animais foram tratados com EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) logo após o treino (retenção de memória) ou 1 h antes do treino (aquisição de memória). A memória de curta e longa duração foi avaliada no modelo da esquiva inibitória 1,5 e 24 h depois do treino, respectivamente. No teste, os animais treinados

foram colocados de costas na plataforma, e o tempo (latência) que eles levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória. O tempo máximo de 180 s foi padronizado como o tempo máximo de espera (latência) para a descida do animal da plataforma durante as avaliações.

### **3.11. Avaliação do desempenho e atividade locomotora**

Visando avaliar o possível efeito sedativo ou mio-relaxante não específico do EE da *H. ampla*, os camundongos pré-tratados foram submetidos ao teste do “Rota-rod” (SANTOS et al., 1999) e campo aberto (RODRIGUES et al., 1996). O “Rota-rod” (Ugo Basile, Model 7600) consiste em uma barra com 2,5 cm de diâmetro, subdividida em 4 compartimentos por discos, que gira a uma velocidade constante de 17 rotações por minuto. Os animais foram selecionados 24 horas antes do experimento, sendo eliminados aqueles que não conseguiam permanecer no aparelho por 3 períodos consecutivos de 60 s. Os animais foram tratados com o EE da *H. ampla* (30 ou 500 mg/kg, v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes do teste. Os resultados foram expressos como o tempo em que o animal permaneceu no aparelho. O tempo máximo de permanência utilizado foi de 60 s.

O comportamento exploratório foi avaliado no teste do campo aberto como descrito previamente por RODRIGUES e colaboradores (1996). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos (“crossings”) com as 4 patas foi contado cumulativamente durante 6 min. Os animais foram tratados com o EE da *H. ampla* (30 ou 500 mg/kg,

v.o.) ou salina (0,9% NaCl, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes da realização do experimento.

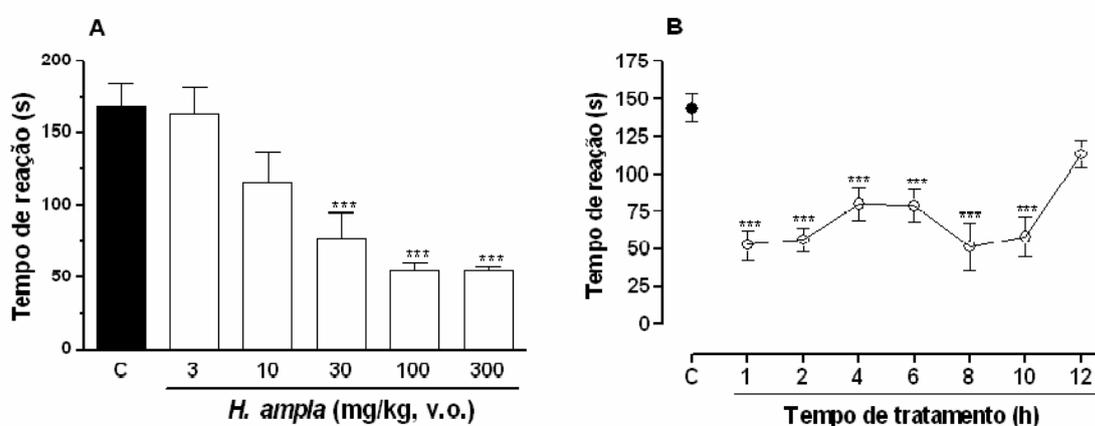
### **3.12. Análise estatística**

Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls ou teste “*t*” não pareado de Student, quando apropriado e expressos como a média  $\pm$  E.P.M. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como indicativo de significância. Os valores da  $DI_{50}$  (dose do EE que reduziu 50% a resposta nociceptiva em relação ao grupo controle [salina]) estão apresentados como média geométrica acompanhada pelo seu respectivo intervalo de confiança (95%). Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos através do método de regressão linear utilizando o software “Graph Pad Instat®” (GraphPad software, San Diego, CA). Os resultados do experimento da esquiva inibitória foram apresentados em medianas acompanhadas dos intervalos interquarties. A diferença entre os grupos foi obtida por estatística não paramétrica através dos testes U de Mann Whitney e teste de Kruskall Wallis.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Nociceção induzida pelo glutamato

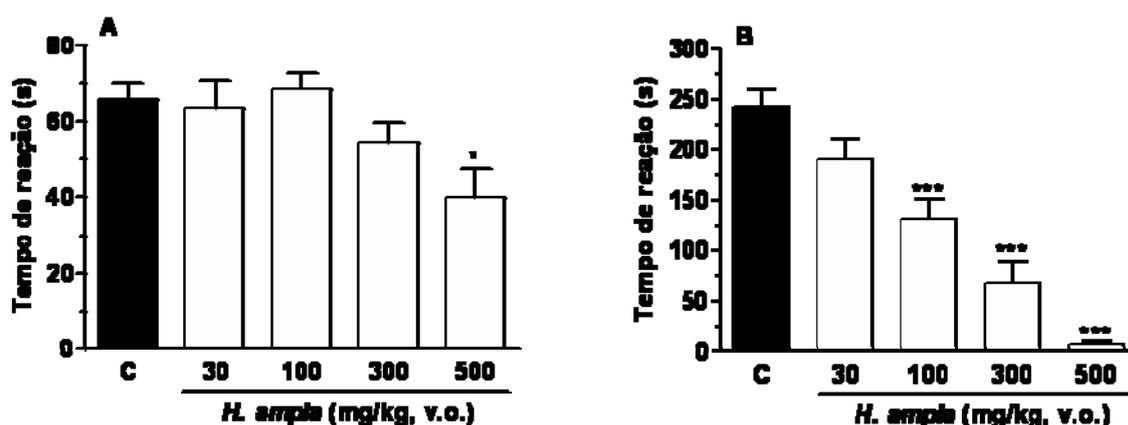
O tratamento sistêmico dos animais com o EE da *H. ampla* (3-300 mg/kg, v.o.) inibiu de forma significativa e dependente da dose a nociceção induzida pela injeção i.pl. de 10  $\mu$ mol/pata de glutamato, com uma  $DI_{50}$  de 19,8 (15,6-25,2) mg/kg e inibição de  $71 \pm 5\%$  na maior dose (Fig. 2A). Além disso, os dados apresentados na Fig. 2B indicam que o efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) é de rápida instalação, com pico de ação em 1 h, sendo eficaz até 10 h após sua administração. Assim, o tempo de 1 h foi escolhido para o pré-tratamento dos animais com o EE da *H. ampla* (v.o.) nos testes subseqüentes.



**Figura 2.** Avaliação do efeito antinociceptivo dependente da dose (3-300 mg/kg, v.o., **A**) e dependente do tempo (30 mg/kg, v.o., **B**) do EE da *H. ampla* na nociceção induzida por glutamato (10  $\mu$ mol/pata) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle (C) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

## 4.2. Nociceção induzida pela formalina

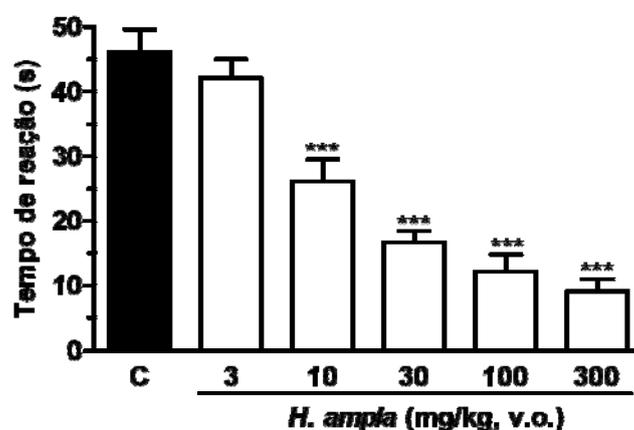
Os resultados apresentados na figura 3 demonstram que o EE da *H. ampla* (30-500 mg/kg, v.o.) inibiu de maneira significativa tanto a fase neurogênica (0-5 min, A) quanto à fase inflamatória (15-30 min, B) da nociceção induzida pela formalina (2,5%). Entretanto, seu efeito antinociceptivo foi significativamente ( $P < 0,05$ ) mais pronunciado na segunda fase deste modelo. Os valores de  $DI_{50}$  para a primeira e segunda fase foram de  $>500,0$  e  $144,5$  ( $119,3-175,1$ ) mg/kg e as inibições causadas pela maior dose foram de  $31 \pm 11$  e  $97 \pm 2\%$ , respectivamente.



**Figura 3.** Efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla* (30-500 mg/kg) administrado pela via oral em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nociceção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao grupo controle (C) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

### 4.3. Nociceção induzida pela capsaicina

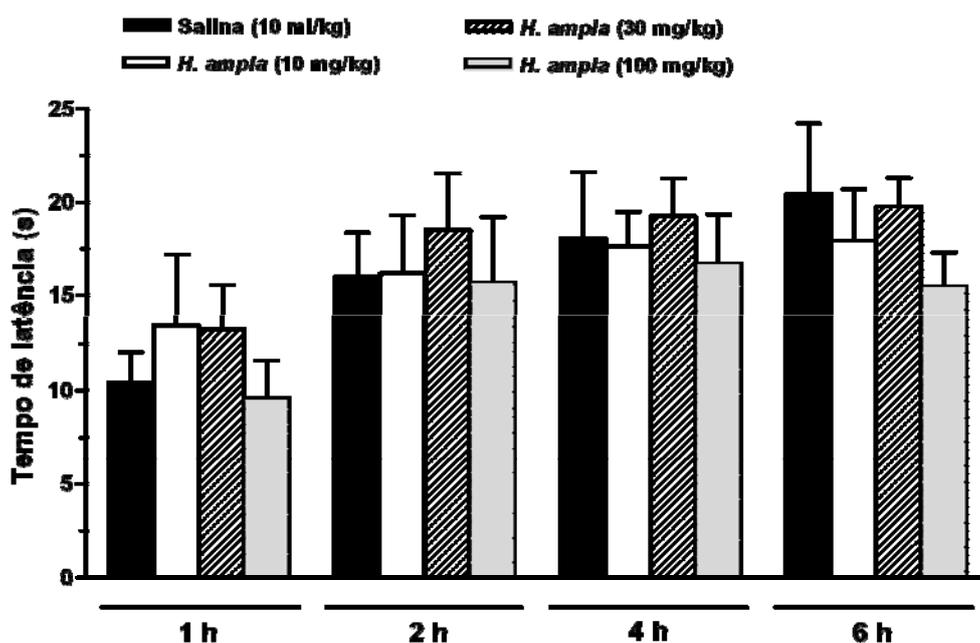
O tratamento dos animais com o EE da *H. ampla* (3-300 mg/kg, v.o.) também produziu uma inibição significativa e dependente da dose na nociceção neurogênica induzida pela capsaicina (1,6 µg/pata, Fig. 4), com  $DI_{50}$  de 20,0 (17,4-23,0) mg/kg e inibição de  $80\pm 4\%$  para a dose de 300 mg/kg.



**Figura 4.** Efeito do EE da *H. ampla* (3-300 mg/kg, v.o.) na nociceção induzida por capsaicina (1,6 µg/pata) em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (C) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

### 4.4. Nociceção térmica induzida por calor radiante – “Teste de retirada da cauda”

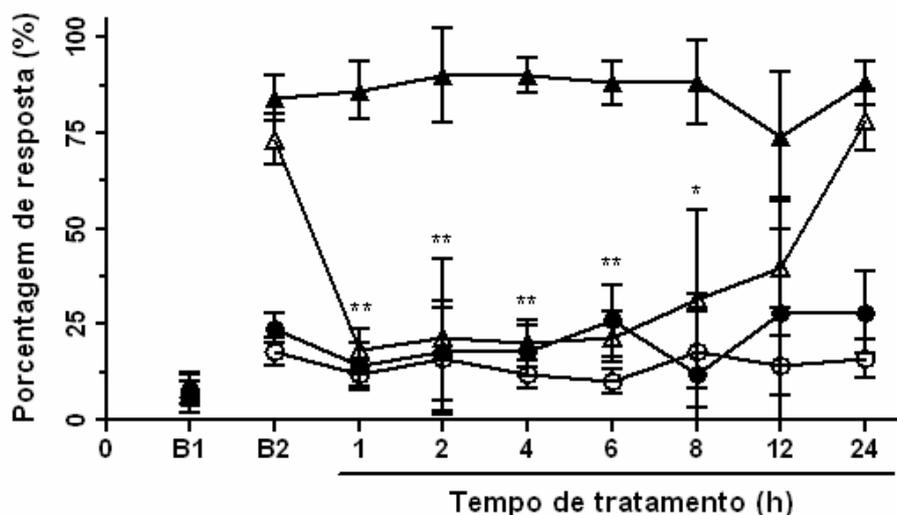
O tratamento dos animais com o EE da *H. ampla* (10-100 mg/kg, v.o.) não foi capaz de aumentar significativamente a latência de retirada da cauda em relação ao grupo controle (salina) nos diferentes tempos observados (Fig. 5).



**Figura 5.** Efeito do EE da *H. ampla* (10-100 mg/kg, v.o.) na nocicepção térmica induzida por calor radiante em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M (pelo teste Student de Newman-Keuls).

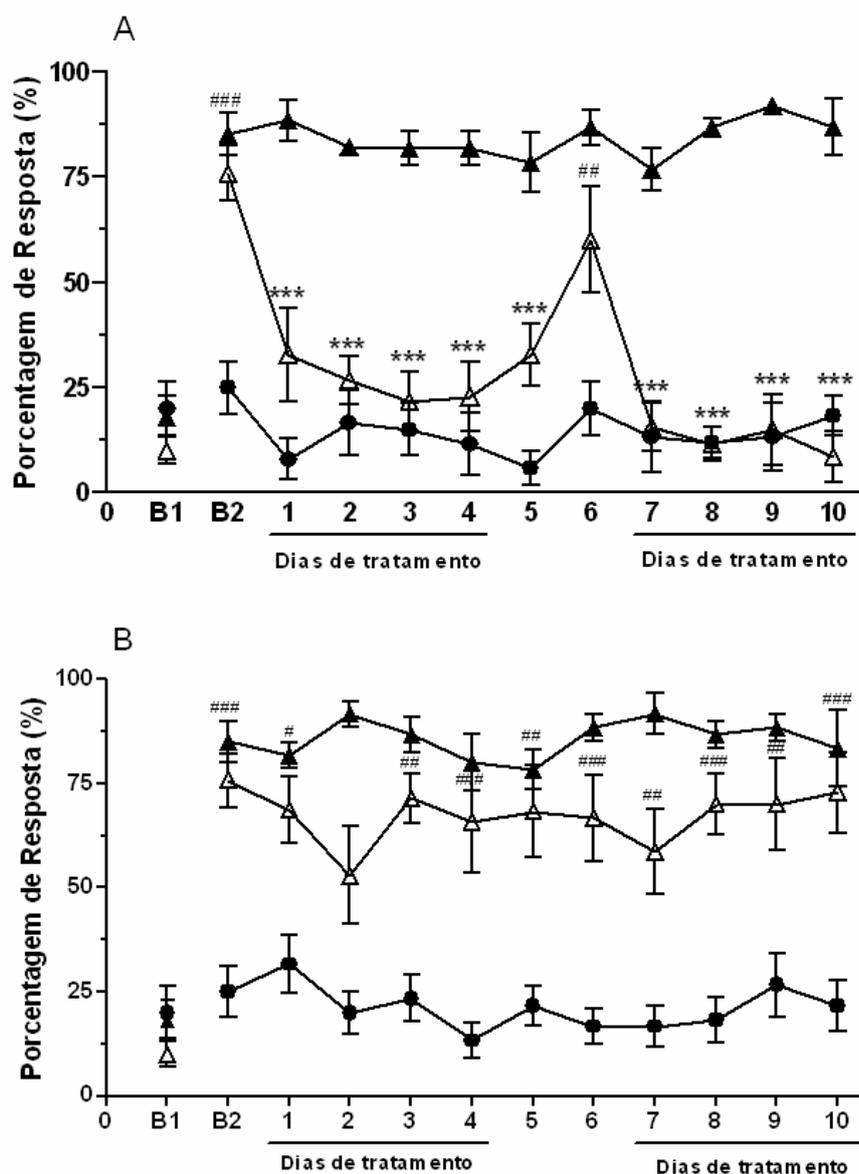
#### 4.5. Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático

O tratamento agudo com EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) diminuiu significativamente a alodínia mecânica avaliada através do filamento de Von Frey na pata dos animais operados, sendo que seu efeito foi mais intenso 1 h (inibição de  $94\pm 8\%$ ) após a sua administração e permaneceu de forma significativa por até 12 horas (Fig. 6). O grupo sham tratado com o EE da *H. ampla* não teve sua resposta sensorial alterada em relação ao grupo sham que recebeu salina (Fig. 6), demonstrando que o tratamento não causa alteração do limiar de resposta em animais que não apresentam a dor neuropática.



**Figura 6.** Efeito do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (▲) representa o grupo operado que recebeu salina (10 ml/kg, v.o); (△) representa o grupo operado e submetido ao tratamento com o EE; (●) representa o grupo sham que recebeu salina (10 ml/kg, v.o); (○) simboliza o grupo sham que recebeu o EE. B1 representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia e B2 o limiar medido 7 dias após a cirurgia sem que os animais tivessem recebido tratamento. Cada grupo representam à média de 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo operado + salina (pelo teste ANOVA de 2 vias).

Quando administrado diariamente, o EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.), demonstrou ser efetivo em reduzir a alodínia mecânica avaliada 2 h (Fig. 7A), mas não 24 h (Fig. 7B) após a sua administração. Além disso, a interrupção do tratamento com o EE no 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dia não afetou a sua eficácia nos dias subsequentes.

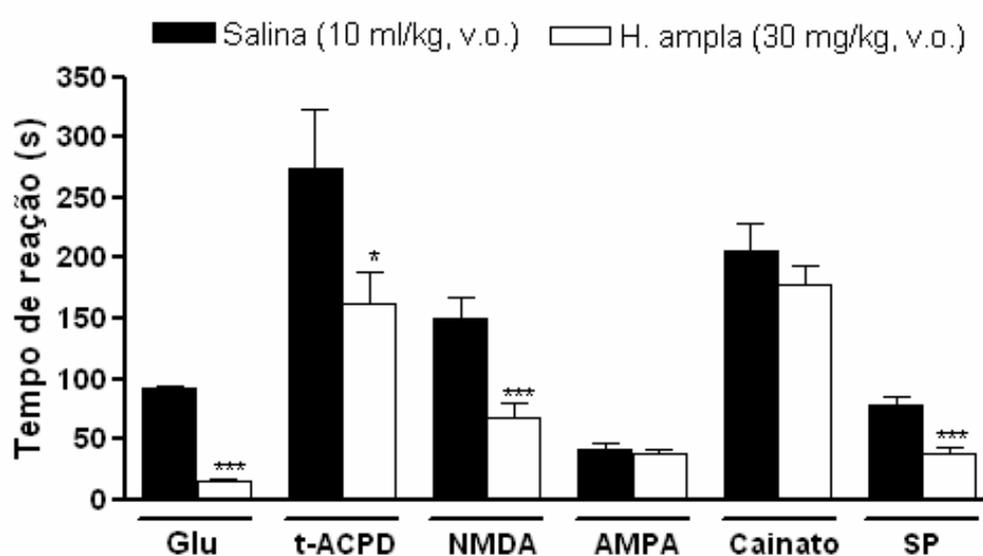


**Figura 7.** Efeito do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) 2 (A) e 24 (B) horas após o tratamento diário, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (▲) representa o grupo operado que recebeu salina (10 ml/kg, v.o.); (△) representa o grupo operado e submetido ao tratamento com o EE; (●) representa o grupo sham que recebeu salina (10 ml/kg, v.o). B1 representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia e B2 o limiar medido 7 dias após a cirurgia sem que os animais tivessem recebido tratamento. Cada grupo representam à média de 6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo operado + salina; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$  representa a diferença em relação ao grupo sham + salina (pelo teste ANOVA de 2 vias).

#### 4.6. Análise dos possíveis mecanismos de ação do EE da *H. ampla*

##### 4.6.1. Envolvimento dos agonistas glutamatérgicos e da substância P

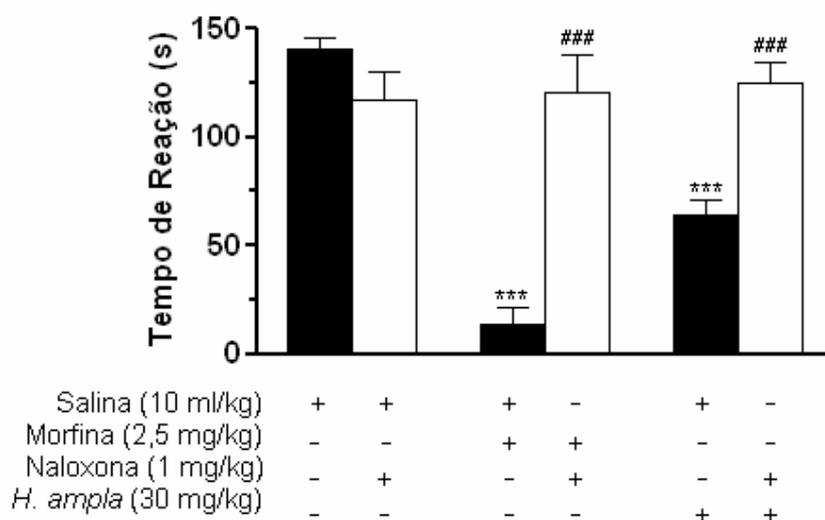
O tratamento dos animais com o EE da *H. ampla* (30 mg/kg), administrado pela via oral 1 h antes do teste, também reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração intratecal de glutamato, trans-ACPD, NMDA e Substância P, com inibições de  $84\pm 2$ ,  $41\pm 10$ ,  $55\pm 8$  e  $53\pm 9\%$ , respectivamente. O mesmo tratamento não foi capaz de inibir a nocicepção induzida por AMPA e cainato (Fig. 8).



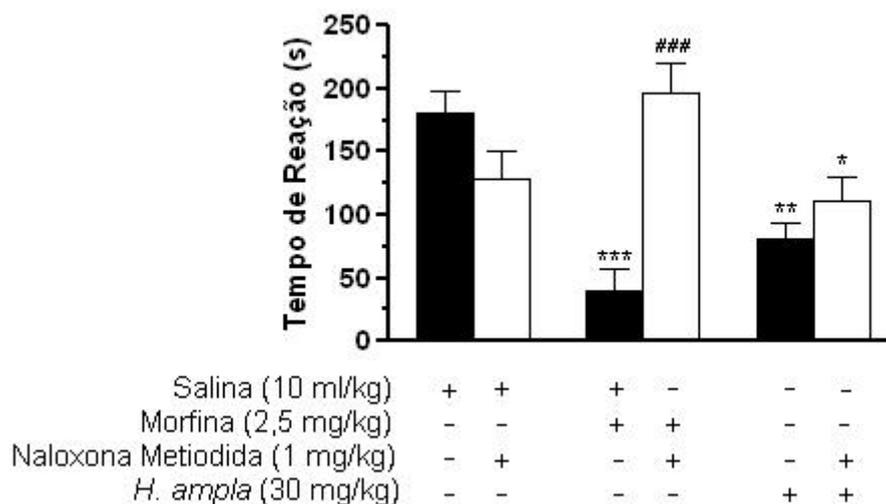
**Figura 8.** Efeito do EE da *H. ampla* (30 mg/kg v.o.) na nocicepção induzida por aminoácidos excitatórios e SP em camundongos. Os agonistas: glutamato (175 nmol/sítio), Trans-ACPD (50 nmol/sítio), NMDA (450 nmol/sítio), AMPA (135 pmol/sítio), Cainato (110 pmol/sítio) e SP (0,1 nmol/sítio) foram injetados intratecal, 1 h após a administração do EE da *H. ampla*. As barras indicam uma media 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos denotam o nível de significância: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo salina (barras cheias) (pelo teste “t” não pareado).

#### 4.6.2. Envolvimento do sistema opióide

Os resultados apresentados na Fig. 9 demonstram que o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores opióides), administrado 20 min antes do EE, morfina ou salina, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pelo EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.) quando analisado no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (i.pl.). Já o tratamento prévio dos animais com naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c., antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica), administrado 20 min antes do EE, morfina ou salina, não reverteu significativamente a antinocicepção causada pelo EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) quando analisado no mesmo modelo. Entretanto, a antinocicepção produzida pela morfina foi significativamente revertida (Fig. 10).



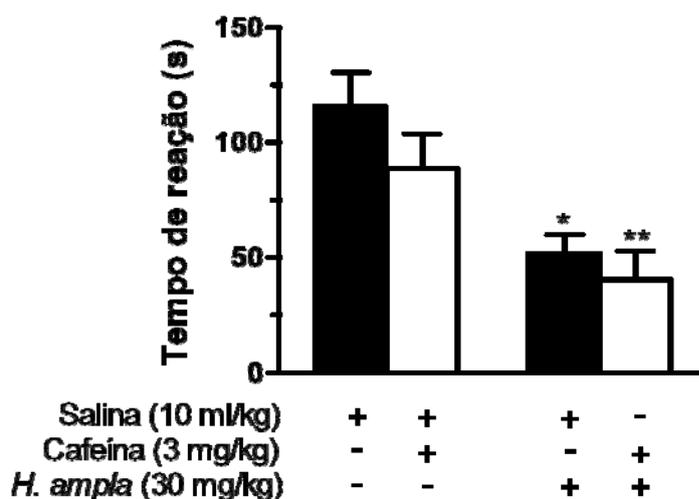
**Figura 9.** Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2.5 mg/kg, s.c.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo salina e ### $p < 0,05$  comparado ao seu próprio controle (salina + morfina ou salina + *H. ampla*) (pelo teste Student de Newman-Keuls).



**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento dos animais naloxona metiodida (1 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2.5 mg/kg, s.c.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo salina e ### $p < 0,05$  comparado ao seu próprio controle (salina + morfina ou salina + *H. ampla*) (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.6.3. Envolvimento do sistema adenosinérgico

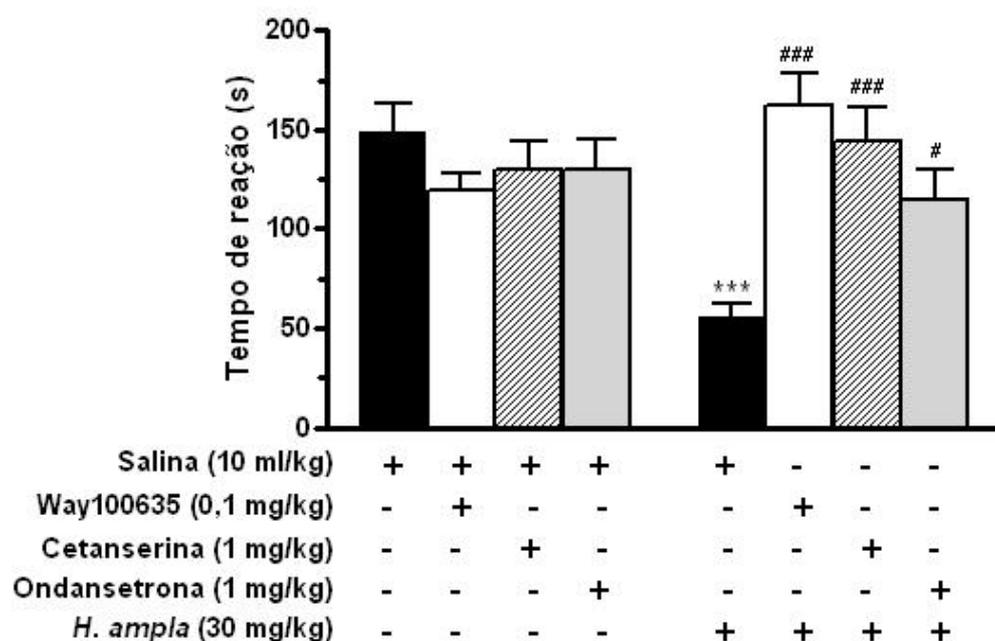
A figura 11 demonstra que o pré-tratamento com cafeína (3 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores adenosinérgico) 20 min antes do tratamento com EE ou salina, não reverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (i.pl.).



**Figura 11.** Efeito do pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  em relação ao grupo salina (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.6.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico

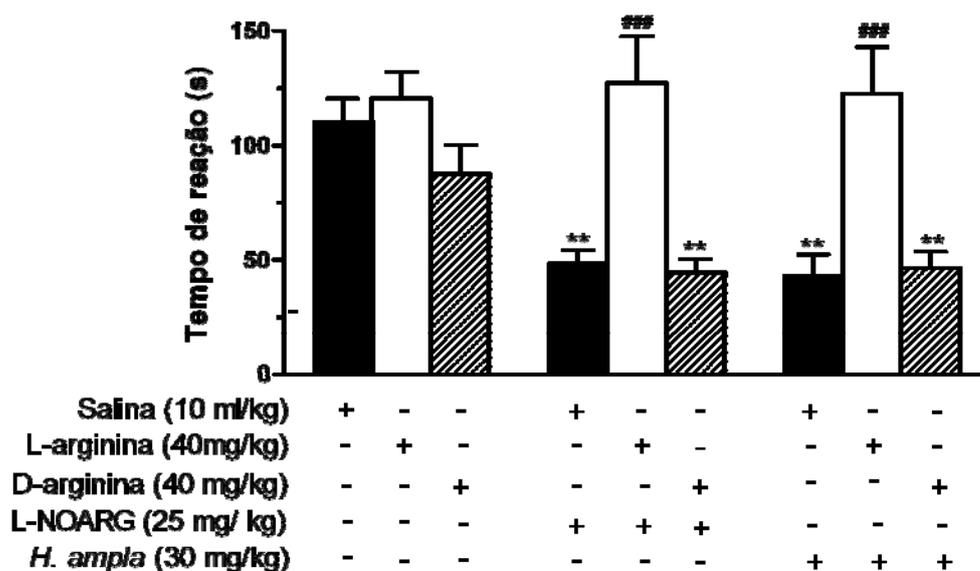
Como podemos observar na figura 12, o efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (i.pl.), foi prevenido completamente pelo pré-tratamento dos animais com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo do subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub>), cetanserina (1 mg/kg, i.p., antagonista preferencial do subtipo de receptor 5-HT<sub>2A</sub>) ou ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p., antagonista preferencial do subtipo de receptor 5-HT<sub>3</sub>).



**Figura 12.** Efeito do pré-tratamento dos animais com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.), cetanserina (1 mg/kg, i.p.) ou ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  em relação ao grupo salina + *H. ampla* (pelo teste ANOVA de 2 vias).

#### 4.6.5. Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico

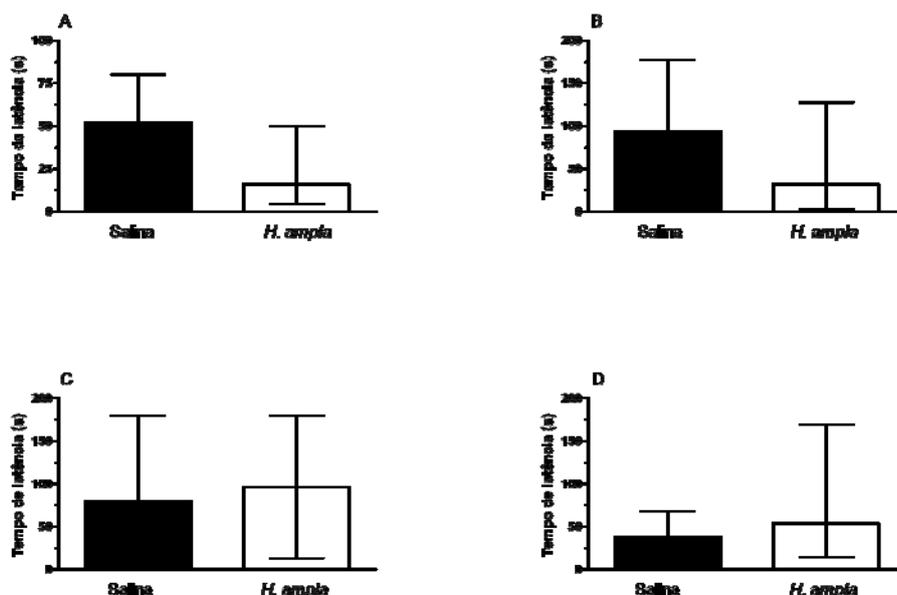
O pré-tratamento sistêmico com o precursor do óxido nítrico, L-arginina (40 mg/kg, i.p.), administrado 20 min antes do tratamento, mas não a D-arginina (40 mg/kg, i.p., isômero inativo da L-arginina), preveniu completamente a antinocicepção causada tanto pela L-NOARG (25 mg/kg, i.p., inibidor da sintase de óxido nítrico) quanto pelo EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato (Fig. 13).



**Figura 13.** Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (40 mg/kg i.p.) ou D-arginina (40 mg/kg i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) e L-NOARG (25 mg/kg, i.p.), no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos. As barras representam a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo salina e ### $p < 0,001$  comparado ao grupo salina + L-NOARG ou salina + *H. ampla* (pelo teste Student de Newman-Keuls).

#### 4.7. Esquiva Inibitória

Os dados apresentados na figura 14 mostram que o EE da *H. ampla*, na dose que produz antinocicepção, não foi capaz de alterar a aquisição (Fig. 14A e B) ou retenção (Fig. 14C e D) da memória de curta (STM, 1,5 h) e longa duração (LTM, 24 h) no modelo de esquiva inibitória em ratas. A administração do EE foi realizada pela via oral 1 hora antes (memória de aquisição) ou logo após (memória de retenção) o treino no aparelho de esquiva inibitória.



**Figura 14.** Efeito do EE da *H. ampla* (30 mg/kg, v.o.) sobre a aquisição (A e B) e retenção (C e D) da memória de curta (STM, A e C) e de longa duração (LTM, B e D), no modelo de esQUIVA inibitória em ratos. As barras indicam uma média de 9 a 12 animais e as linhas verticais denotam a mediana acompanhada pelo seu intervalo interquartil (pelos testes de Mann Whitney seguido de Kruskal Wallis).

#### 4.8. Avaliação do desempenho e atividade locomotora

O EE da *H. ampla* (30 e 500 mg/kg) administrado pela via oral não afetou significativamente a atividade muscular, nem apresentou atividade sedativa nos animais quando testados em relação ao desempenho e atividade locomotora nos testes do “Rota-rod” e campo aberto, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do EE da *H. ampla* sobre a performance motora (“Rota-rod”) e atividade locomotora (campo aberto) de camundongos.

Tratamento	“Rota-rod” (s)	Campo Aberto (n <sup>o</sup> . de cruzamentos)
Salina (10 ml/kg, v.o.)	60,0 ± 0,0	169,5 ± 11,7
EE da <i>H. ampla</i> (30 mg/kg, v.o.)	60,0 ± 0,0	190,5 ± 16,5
EE da <i>H. ampla</i> (500 mg/kg, v.o.)	56,7 ± 3,3	171,5 ± 13,5

\*Os valores representam a média + E.P.M. de 7 a 8 animais

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a administração sistêmica, pela via oral, do extrato etanólico (EE) obtido das raízes da *Humirianthera ampla* produziu significativo efeito antinociceptivo nos diferentes modelos de nocicepção química avaliados em camundongos.

Os resultados apresentados mostraram que a administração do EE da *H. ampla* por via oral produziu uma inibição significativa e duradoura da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver sítios periféricos, espinhais e supra-espinhais, tendo sua ação mediada amplamente por receptores NMDA e não NMDA, assim como, pela liberação de óxido nítrico ou por algumas vias de transdução moduladas por nitro derivados (BEIRITH et al., 2002, 2003; ROSA et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado que os receptores de aminoácidos excitatórios estão envolvidos na transmissão aferente primária nociceptiva, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta dolorosa (AANONSEN e WILCOX, 1987, 1990; COGGESHALL e CARLTON, 1997; FERREIRA et al., 1999). Desta forma, a supressão da nocicepção induzida pelo glutamato em função do pré-tratamento dos animais com o EE da *H. ampla* pode estar associada a sua interação com o sistema glutamatérgico ou com a produção do óxido nítrico (FERREIRA et al., 1999; BEIRITH et al., 2003).

Quando avaliado no modelo de nocicepção induzida pela formalina em camundongos, o EE da *H. ampla* (v.o.) também causou significativo efeito antinociceptivo tanto na nocicepção neurogênica (primeira fase) quanto na

inflamatória (segunda fase). A dor neurogênica é causada por ativação direta dos terminais de fibras nociceptivas, enquanto a dor inflamatória é mediada por uma combinação de mediadores periféricos e sensibilização da medula espinhal (TJØLSEN et al., 1992). Tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento nos níveis espinhais de diferentes mediadores, como aminoácidos excitatórios, prostaglandina E<sub>2</sub>, óxido nítrico, taquicininas, entre outros peptídeos (TJØLSEN et al., 1992; MALMBERG e YAKSH, 1995).

Outro fato interessante do presente estudo é a demonstração de que o EE da *H. ampla*, administrado pela via oral, causou redução significativa da nocicepção neurogênica induzida pela ativação de receptores vanilóides (TRPV1) por utilização da capsaicina na pata de camundongos (CATERINA e JULIUS, 2001). A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é uma substância álgica obtida da pimenta vermelha, *Capsium annuum* L., disponível como ferramenta farmacológica para o estudo do subtipo de fibras sensoriais primárias do tipo C e A $\delta$ , incluindo os nociceptores polimodais e termocetores (HOLZER, 1991; JANCOSO, 1992). Estudos têm demonstrado que a capsaicina induz a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), óxido nítrico, mediadores pró-inflamatórios na periferia, além de promover a transmissão de informações nociceptivas para a medula espinhal (SZALLASI e BLUMBERG, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 2003). A diferença de potência do EE observada nos modelos da formalina e da capsaicina justifica-se pelo fato da capsaicina atuar diretamente sobre receptores vanilóides, enquanto a formalina atua sobre diferentes tipos de receptores exercendo uma ação mais ampla.

Baseado nestes primeiros resultados surgiu à hipótese de que o EE da *H. ampla* poderia exercer seu efeito antinociceptivo por interagir com o sistema nervoso central, modulando receptores glutamatérgicos. Os receptores glutamatérgicos são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e são divididos em dois grandes grupos: ionotrópicos (acoplados a canais iônicos na membrana) e metabotrópicos (mGluRs, acoplado a proteína G). Recentes evidências obtidas através da utilização de agonistas e antagonistas seletivos de receptores glutamatérgicos, sugerem que todos os subtipos de receptores ionotrópicos NMDA, AMPA, cainato e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (grupo I, II e III) possuem relevante papel na estabilização ou manutenção de estados dolorosos tanto na nocicepção aguda quanto crônica (NEUGEBAUER, 2001; CARLTON, 2001; SCHEIDT et al., 2002; VARNEY e GEREAU, 2002; SAWYNOK, 2003). Evidências também sugerem que o glutamato e alguns neuropeptídeos, especialmente a SP, co-existam em ambas as fibras nociceptivas periféricas de pequeno e grande diâmetro (DE BIASI e RUSTIONI, 1988; SMULLIN et al., 1990; URBAN e NAGY, 1997).

A SP aumenta a nocicepção induzida pelo glutamato (CARLTON et al., 1998) e os dois neurotransmissores podem atuar sinergicamente na transmissão da dor (TEOH et al., 1996; RUSIN et al., 1993; MALCANGIO et al., 1998; BEIRITH et al., 2003). Dados da literatura indicam que receptores metabotrópicos do grupo I (mGluR1 e mGluR5) são expressos tanto pré quanto pós-sinápticamente ao longo do neuroeixo da dor, portanto, eles podem modular a transmissão nociceptiva (FISHER e CODERRE, 1996; BOXALL et al., 1998; BHAVE et al., 2001; WALKER et al., 2001; VARNEY e GEREAU, 2002). Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que a antinocicepção

produzida pelo EE da *H. ampla* envolve o sistema glutamatérgico. Tal sugestão deriva do fato que o EE da *H. ampla* (v.o.) foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de glutamato (agonista não seletivo de receptores glutamatérgicos), NMDA (agonista seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo NMDA) e em menor proporção, trans-ACPD (agonista de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do grupo I e II). Porém, o EE da *H. ampla* não inibiu a nocicepção induzida pelos agonistas seletivos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do subtipo AMPA e cainato. Além disso, o presente trabalho também mostra que o EE da *H. ampla* foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção induzida pela administração intratecal da SP.

De fato, o comportamento indicativo de dor que pode ser observado após a administração espinal da SP é potencializado pela co-administração de NMDA (MJELLEM et al., 1992). Existem dados da literatura que mostram que receptores NMDA pré-sinápticos, localizados no terminal de fibras nociceptivas de pequeno diâmetro, facilitam e prolongam a transmissão de mensagens nociceptivas, através da liberação de SP e glutamato (MALCANGIO et al., 1998). Com base nesses dados, podemos especular que o EE da *H. ampla*, atuando em receptores NMDA da medula espinal, pode reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela SP. Contudo, estudos adicionais de “binding” são necessários para confirmar esta hipótese.

Com o intuito de avaliar o efeito do EE da *H. ampla* frente a diferentes estímulos nociceptivos, foi utilizado o modelo de nocicepção térmica induzida por uma fonte de calor radiante (modelo de retirada da cauda). Os nossos dados mostram claramente que o EE da *H. ampla* não foi capaz de aumentar a

latência dos animais ao estímulo térmico no teste de retirada da cauda. O modelo de retirada da cauda não é ocasionado apenas por um reflexo puramente espinhal, ele também está sujeito ao controle de estruturas supra-espinhais (MITCHELL e HELLON, 1977). Primeiramente acreditava-se que os opióides produzissem analgesia através de ações no sistema nervoso central (JAFFE e MARTIN, 1990). Entretanto, estudos em animais (STEIN, 1993) e mais recentemente humanos (KHOURY et al., 1992) têm demonstrado que mecanismos opióides periféricos também podem participar da antinocicepção.

Em outra etapa do nosso protocolo experimental, foi analisado o possível efeito antinociceptivo do EE da *H. ampla* na neuropatia, tendo em vista que ela envolve tanto os mediadores químicos que participam da nocicepção neurogênica quanto da inflamatória. De fato, os resultados obtidos no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos, demonstram que o EE da *H. ampla* produziu inibição significativa da alodínia mecânica por até 12 horas após a sua administração. Além disso, os nossos resultados mostram que o EE administrado uma vez ao dia, durante 4 dias, reduziu significativamente a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático. Este efeito foi evidente até o 4<sup>o</sup> dia de tratamento (inibição:  $84 \pm 12\%$ ). Contudo, quando o tratamento foi interrompido por 2 dias, a alodínia mecânica foi restabelecida. No 7<sup>o</sup> dia, o tratamento dos animais com o EE foi reiniciado e observou-se que o mesmo foi capaz de reduzir a alodínia mecânica semelhante ao tratamento agudo, indicando que o EE parece não apresentar efeito cumulativo nem induzir tolerância.

As sensações de dor estão normalmente relacionadas à ativação de neurônios aferentes primários não mielinizados (fibras C) ou pouco

mielinizadas (fibras A $\delta$ ), que são normalmente silenciosos na ausência de estimulação, e respondem melhor aos estímulos que são potencialmente nocivos. Entretanto, após a lesão no nervo periférico, estes neurônios tornam-se anormalmente sensíveis e desenvolvem atividade espontânea patológica (BARON, 2006). A atividade espontânea ectópica seguida pela lesão do nervo é produzida pelo aumento na expressão de RNA<sub>m</sub> para canais de sódio dependentes de voltagem em neurônios aferentes primários. De fato, após a lesão do nervo periférico, grupos de canais de sódio se acumulam não apenas no local da lesão do nervo, mas também dentro do gânglio da raiz dorsal próximo à lesão (HAINS et al., 2004). Contudo, os dados obtidos no presente estudo não permitem avaliar a possível ação do EE sobre os canais de sódio.

Da mesma forma, canais de cálcio voltagem dependente do tipo N, localizados pré-sinápticamente no terminal de nociceptores aferentes primários têm também um importante papel na sensibilização central, através da facilitação de liberação de glutamato e SP. Estes canais são super expressos depois da lesão do nervo periférico (LUO et al., 2001). Dados da literatura sugerem que o aumento da produção local do óxido nítrico (NO) também é importante para a manutenção da dor neuropática em ratos (NAIK et al., 2006). A nNOS é expressa em neurônios da raiz dorsal na medula espinhal, e o aumento do NO evoca a liberação de neuropeptídeos excitatórios (GARRY et al., 2000), um efeito que poderia aumentar a neurotransmissão da dor. Além dos neurônios espinhais, a nNOS é também expressa nos terminais centrais de fibras aferentes (DUN et al., 1993) e a expressão da nNOS está aumentada no gânglio da raiz dorsal depois da lesão do nervo (LUO et al., 1999). Esses

dados corroboram com nossos resultados que demonstram a interação do EE da *H. ampla* com o sistema glutamatérgico, a SP e a via do óxido nítrico.

Visto que o EE da *H. ampla* apresentou ação antinociceptiva em diferentes modelos químicos e mecânico de nocicepção, o modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato foi escolhido para a realização de experimentos com o intuito de elucidar os possíveis mecanismos de ação através dos quais o EE da *H.ampla* poderia estar atuando para produzir o seu efeito antinociceptivo. Dentre os sistemas envolvidos na ativação e inibição das vias nociceptivas, foram investigados os sistemas glutamatérgico, opióide, adenosinérgico, serotoninérgico, além da via L-arginina-óxido nítrico.

Ao investigar a participação do sistema opióide na ação antinociceptiva do EE da *H. ampla* observamos que apenas os mecanismos centrais parecem estar envolvidos. Esses dados foram obtidos pelo pré-tratamento dos animais com naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, com uma dose que não produz nenhum efeito significativo sobre a nocicepção induzida pelo glutamato. A naloxona inibiu completamente o efeito antinociceptivo induzido pela morfina e pelo EE da *H. ampla*. Ao contrário do pré-tratamento dos animais com naloxona metiodida (antagonista não seletivo de receptores opióides, que não atravessa a barreira hemato-encefálica), que reverteu a antinocicepção causada pela administração sistêmica de morfina, mas falhou em reverter a antinocicepção induzida pelo EE da *H. ampla*, quando analisada na nocicepção induzida pelo glutamato. Tem sido proposto que periféricamente, agonistas de receptores  $\mu$ -opióides atuam inibindo a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários por mediadores

inflamatórios como a serotonina e PGE<sub>2</sub>, enquanto agonistas de receptores  $\delta$  e  $\kappa$  opióides inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (LEVINE e TAIWO, 1989; TAIWO e LEVINE, 1991). Agonistas de receptores  $\mu$ -opióides podem também inibir a liberação da Substância P de neurônios aferentes primários (YAKSH, 1988; BELVISI et al., 1989), efeito que é consistente com dados que indicam que opióides endógenos suprimem o processo inflamatório ajudando a reduzir a hiperalgesia (MILLAN e COLPAERT, 1991). Dados da literatura têm mostrado que, além dos mecanismos centrais já bem descritos, o efeito opióide pode também contar com um componente periférico. Isto tem sido bem ilustrado em experimentos que mostram que o efeito antinociceptivo opióide pode ser revertido tanto por naloxona (NAL, antagonista não seletivo de receptores opióides) como por seu derivado quaternário, naloxona metiodida (NAL-M, antagonista não seletivo de receptores opióides que não atravessa a barreira hemato-encefálica) (LEWANOWITSCH e IRVINE, 2002; LEWANOWITSCH et al., 2004). A NAL-M é utilizada como ferramenta de pesquisa para distinguir entre sítios centrais e periféricos de ação das drogas nos receptores opióides (BROWN e GOLDBERG, 1985). Entretanto, dados da literatura demonstram que a NAL-M tem menor afinidade por receptores opióides quando comparado a NAL (MANARA et al., 1982; BIANCHETTI et al., 1983; VALENTINO et al., 1983; DEVICHE, 1997). Acredita-se, porém, que os opióides produzam analgesia primariamente por sua ação no sistema nervoso central (PASTERNAK, 1988; JAFFE e MARTIN, 1990). A distribuição dos receptores opióides dentro das diferentes lâminas da medula espinhal, pode também ser de interesse para explicar a relativa eficácia dos agonistas opióides. Nesse sentido, receptores  $\mu$ -

opióides possuem RNA<sub>m</sub> amplamente expressos nas lâminas I e II, onde terminam principalmente as fibras C e A $\delta$ . Similarmente, receptores  $\kappa$ -opióides tem o seu RNA<sub>m</sub> intensamente expressos nas lâminas I e II, mas também na lâmina V. Já o RNA<sub>m</sub> de receptores  $\delta$ -opióides é pouco expresso nas lâminas I-VI (SATOH e MINAMI, 1995; GALLANTINE e MEERT, 2004).

Além disso, os receptores  $\mu$ -opióides são expressos pré e pós-sinápticamente em terminais de neurônios aferentes primários que contêm SP. Após ocupar este receptor, os opióides podem produzir seu efeito analgésico por alterar a condutância de potássio na membrana causando uma hiperpolarização, atenuando dessa forma a excitabilidade do terminal nociceptivo ou inibindo a propagação do potencial de ação. Esta hiperpolarização também diminui a liberação de neurotransmissores dependentes de cálcio, incluindo SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato, que estão co-localizados nos terminais de neurônios aferentes primários (REICHERT et al., 2001; GALLANTINE e MEERT, 2004). Já os receptores  $\kappa$ -opióides manifestam seus efeitos por mecanismos de ação similares, através de receptores periféricos. Uma vez ativados, eles previnem a abertura de canais de cálcio em neurônios que contêm SP e dessa forma diminuem a liberação de neurotransmissores dependentes de cálcio (SATOH e MINAMI, 1995). Por outro lado, os receptores  $\delta$ -opióides estão super expressos na presença de inflamação, o que pode aumentar a eficácia de seus agonistas em estágios tardios da inflamação (ZHOU et al., 1998; GALLANTINE e MEERT, 2004).

A ativação de receptores  $\mu$ -opióides também pode induzir a liberação de adenosina endógena por aumentar a concentração de cálcio intracelular, via

canais de cálcio do tipo N, ou por ativação da proteína quinase C (SAWYNOK e LIU, 2003). Com base nestes dados, e tendo em vista que o EE da *H. ampla* teve seu efeito revertido pela naloxona, a possível interação com o sistema adenosinérgico foi investigada. Contudo, nossos dados mostram que o pré-tratamento dos animais com cafeína, antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, com uma dose que antagoniza as respostas induzidas por agonistas adenosinérgicos (MALEC e POLESZAK, 2005), falhou em suprimir o efeito antinociceptivo causado pela administração oral do EE da *H. ampla* no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. A adenosina atuando em receptores  $A_1$  pré-sinápticos, induz a diminuição da produção de  $AMP_c$  e a inibição dos canais de cálcio voltagem dependente, gerando uma diminuição na liberação de acetilcolina, SP ou CGRP (SAWYNOK e LIU, 2003; PEANA et al., 2006). Já a sua ativação pós-sináptica induz a abertura de vários subtipos de canais de potássio. Adicionalmente, dados da literatura demonstram que os receptores de adenosina  $A_{2A}$  também participam da modulação da dor em níveis espinhais e supra espinhais (PHAM et al., 2003; PEANA et al., 2006).

Similarmente à naloxona, os antagonistas dos receptores de serotonina (5-HT): WAY100635 (preferencial 5-HT<sub>1A</sub>), cetanserina (preferencial 5-HT<sub>2A</sub>) e ondasetrona (5-HT<sub>3</sub>), foram efetivos em reverter de forma significativa a antinocicepção causada pelo EE da *H. ampla* (v.o.) no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato. Já é bem conhecido que as vias serotoninérgicas no sistema nervoso central chegam de uma série de núcleos situados na linha média do tronco encefálico, o núcleo da Rafe, o qual representa uma valiosa fonte de síntese neuronal de 5-HT em mamíferos (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da Rafe tem sido implicado no efeito

regulatório de antidepressivos em transtornos do humor (ARTIGAS et al., 1996) assim como na modulação da dor (MILLAN, 2002) e o núcleo da Rafe magno é provavelmente o mais importante núcleo serotoninérgico do controle de transmissão descendente da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado que drogas antidepressivas são capazes de produzir marcante analgesia em humanos e animais (CARTER e SULLIVAN, 2002; MILLAN, 2002). Geralmente manipulações que aumentam os níveis de 5-HT facilitam a antinocicepção e aqueles que diminuem a síntese ou a transmissão mediada pelo receptor de 5-HT atenuam a antinocicepção. Os neurônios magnocelulares reticulares são a principal fonte de 5-HT dentro do corno dorsal. Dados da literatura formulam a hipótese de que esses neurônios serotoninérgicos são fundamentais para a antinocicepção induzida por estimulação da substância cinzenta periaquedutal ou do sistema opióide (MASON e GAO, 1998; MASON, 1999).

Outro resultado interessante do presente estudo foi à demonstração de que a via L-arginina-óxido nítrico parece estar amplamente envolvida na antinocicepção induzida pelo EE da *H. ampla*. Estas conclusões derivam do fato de que o pré-tratamento dos camundongos com o substrato da síntese do óxido nítrico, L-arginina, numa dose que não produz nenhum efeito sobre a nocicepção induzida pelo glutamato, significativamente reverteu a antinocicepção causada pelo EE da *H. ampla* e L-NOARG (um conhecido inibidor da enzima NOS). O mesmo não ocorreu com o pré-tratamento dos animais com o isômero inativo da L-arginina, D-arginina, que não exerceu nenhum efeito significativo sobre a antinocicepção induzida pelo EE da *H. ampla* e L-NOARG. Esses resultados corroboram dados da literatura que

demonstram que a liberação do NO pode ser estimulada pela ativação de receptores glutamatérgicos e vice-versa (LIN et al., 2000; OZEK et al., 2003), visto que o EE da *H. ampla* foi efetivo em inibir a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato, trans-ACPD e NMDA. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* com doadores de NO, inibidores da NOS e antagonistas de receptores glutamatérgicos sugerem que em várias áreas do encéfalo e medula espinhal, o NO aumente a liberação de glutamato (PRAST et al., 1998). Desta forma, ao atuar inibindo a via L-arginina-óxido nítrico, o EE da *H. ampla* pode conseqüentemente inibir a liberação de glutamato propiciando a redução da resposta nociceptiva. Porém, estudos complementares com inibidores da síntese óxido nítrico e verificação da liberação de glutamato são necessários para confirmar tal hipótese.

Uma vez que o EE da *H. ampla* demonstrou atuar sobre o sistema glutamatérgico e L-arginina-óxido nítrico, surgiu à dúvida se o EE poderia estar exercendo algum efeito também sobre a memória, já que dados da literatura demonstram a participação do sistema glutamatérgico sobre a memória e a interação do NO com receptores glutamatérgicos (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). De acordo com CAMMAROTA e colaboradores (2005) a consolidação da memória no teste da esQUIVA inibitória requer a ativação de receptores glutamatérgicos na região CA1 do hipocampo (VIANNA et al., 2001; SZAPIRO et al., 2003), amígdala basolateral e central (BAHAR et al., 2003; IZQUIERDO et al., 2004) e córtex insular (BERMAN e DUDAI, 2001). O papel da transmissão glutamatérgica na memória pode também ser verificado com a observação da administração de antagonistas competitivos e não-competitivos de receptores NMDA, que prejudicam o desempenho da memória em roedores

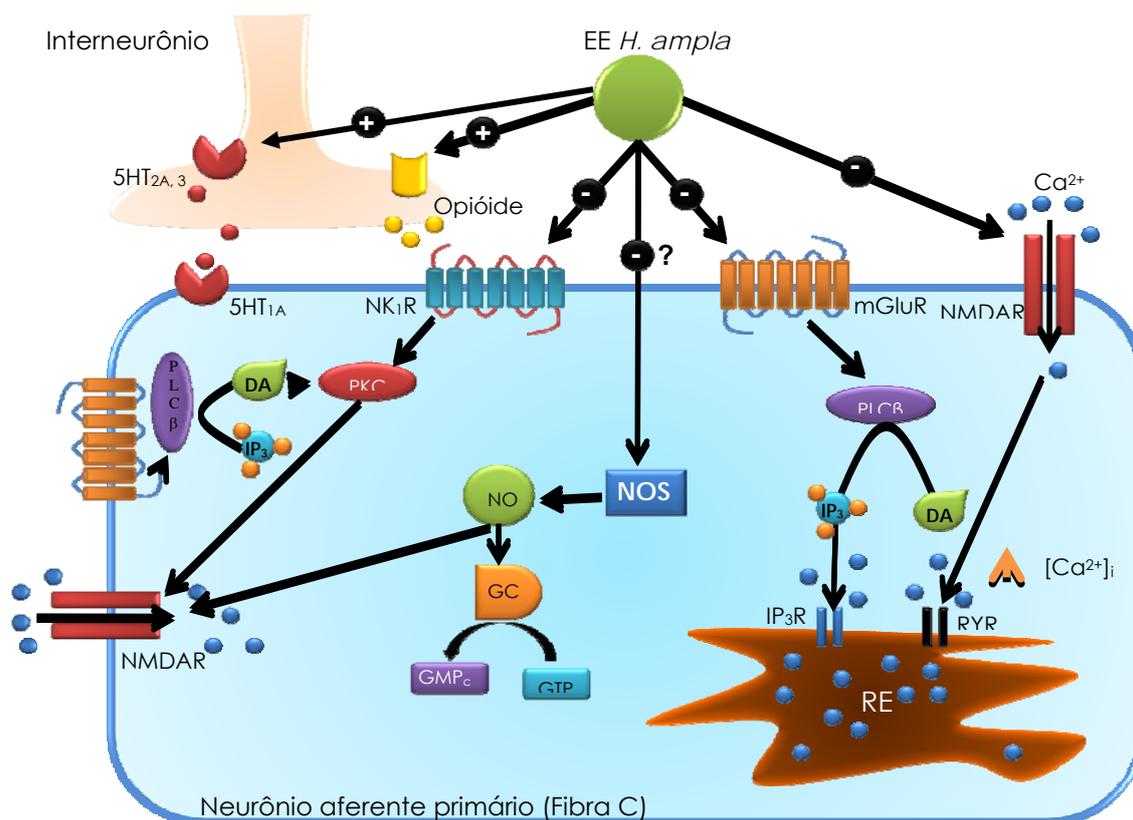
em uma variedade de comportamentos (HEALE e HARLEY, 1990; CASTELLANO et al., 2001; GOULD et al., 2002; HLINAK e KREJRI, 2002; BAST et al., 2003). Por essa razão, foi investigado se o tratamento com o EE da *H. ampla* (v.o.) que atua inibindo o sistema glutamatérgico e a produção de NO, numa dose que produz antinocicepção, causaria algum prejuízo à memória. Nossos dados mostram que a administração do EE da *H. ampla*, em dose que parece atuar no sistema glutamatérgico, tanto através de receptores ionotrópicos como metabotrópicos, e a via do NO, não teve nenhum efeito significativo sobre a aquisição e retenção da memória, tanto de longa quanto de curta duração, no modelo de esQUIVA inibitória em ratas.

É conhecido que a injeção sistêmica do antagonista do receptor NMDA, MK-801, reduz o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intratecal de alguns aminoácidos excitatórios e SP (GADOTTI et al., 2006). De acordo com esse dado, CODERRE e VAN EMPEL (1994) mostraram que doses de antagonistas de alguns aminoácidos excitatórios, como o MK-801, que produz significativo efeito antinociceptivo, também resulta em efeitos não específicos como ataxia, descordenação motora e depressão do sistema nervoso central. Portanto, é visto que o prejuízo motor induzido pelo antagonista do receptor NMDA poderia influenciar o efeito antinociceptivo da droga. Alternativamente, o déficit motor do antagonista do receptor do NMDA é produzido concomitantemente com antinocicepção e os dois efeitos não podem ser separados, sugerindo uma limitação para seu uso terapêutico (FUNDYTUS, 2001). Por essa razão, o EE da *H. ampla* foi analisado quanto a sua possível ação inibitória da atividade motora no teste do “Rota-rod” e campo aberto. Em ambos os testes observou-se que os animais tratados com o EE da *H. ampla*,

pela via oral, com doses que foram efetivas nos modelos de nocicepção utilizados, não apresentaram alteração significativa da performance motora. Dessa forma, ao contrário do que foi descrito para o MK-801 (GADOTTI et al., 2006), o EE da *H. ampla* apresenta ação antinociceptiva significativa e específica contra a nocicepção induzida por glutamato, NMDA, trans-ACPD e SP.

Em síntese, o estudo demonstrou que a administração sistêmica (v.o.) do EE obtido das raízes da *H. ampla* produziu inibição da nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos (Fig. 15). Além disso, os resultados encontrados demonstram que: (1) a administração do EE da *H. ampla* (v.o.) causou inibição significativa da nocicepção neurogênica e inflamatória induzida pela formalina, e da nocicepção neurogênica induzida pela capsaicina em camundongos; (2) o pré-tratamento com o EE foi inefetivo em inibir a nocicepção térmica, avaliada no modelo de retirada da cauda; (3) a neuropatia, induzida pela constrição parcial do nervo ciático foi inibida pelo tratamento dos animais com o EE da *H. ampla*; (4) a administração oral do EE inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal de glutamato, NMDA, trans-ACPD e SP, mas não afetou o mesmo tipo de resposta induzida injeção intratecal de AMPA ou cainato; (5) a ação antinociceptiva do EE no modelo do glutamato foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com naloxona, L-arginina, WAY100635, cetanserina e ondansetrona, mas não por naloxona metiodida ou cafeína; (6) e que o EE da *H. ampla* causou significativa antinocicepção em doses que não produzem nenhuma alteração motora em camundongos e nem afetam a aquisição ou retenção da memória em ratos.

Como descrito na anteriormente, alguns compostos isolados já foram identificados a partir do EE obtido das raízes da *H. ampla*, como por exemplo: ftalato, lupeol,  $\beta$ -sitosterol, sitosterol glicosilado, além de três diterpenos denominados: annonalida, acrenol e humirianthol (GRAEBNER et al., 2000). Dados da literatura demonstram que o lupeol, o  $\beta$ -sitosterol e os terpenos em geral apresentam atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção e inflamação (SANTOS et al., 1995; SINGH et al., 1997). Além disso, estudos com o EE da *H. ampla* em modelos farmacológicos de edema de pata de rato, avaliação da permeabilidade vascular e de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, demonstraram que o EE desta planta apresenta atividade antiinflamatória (LIMA et al., 2000). Porém, estudos farmacológicos, bioquímicos, químico e de biologia molecular são necessários para dar continuidade ao estudo e caracterizar de maneira precisa os compostos isolados e os mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva do EE da *H. ampla*.



**Figura 15.** Prováveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do EE da *H. ampla*. O EE da *H. ampla* parece exercer sua atividade antinociceptiva por interagir com os sistemas glutamatérgico (através dos receptores metabotrópicos e NMDA), serotoninérgico (através dos receptores 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>3</sub>) e opióide (ação central). Além disso, a SP e a via do óxido nítrico também parecem estar envolvidos na sua ação antinociceptiva. NK<sub>1</sub>R – receptor de neurocinina 1, PKC – proteína quinase C, NOS – sintase de óxido nítrico, NO – óxido nítrico, GC – guanilato ciclase, GMP<sub>c</sub> – Monofosfato cíclico de 3'5' - guanosina, GTP – guanosina-5'-trifosfato, RE – retículo endosarcoplasmático, RYR – receptor de rianodina, IP<sub>3</sub>R – receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – concentração de cálcio intracelular, IP<sub>3</sub> – inositol 1,4,5-trisfosfato, DAG – diacilglicerol, PLCβ – fosfolipase C β, mGLUR – receptor glutamatérgico metabotrópico, NMDAR – receptor de NMDA, (+) ativação, (-) inibição.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O EE da *H. ampla* apresenta efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química induzida pelo glutamato, formalina e capsaicina em camundongos;
- A nocicepção térmica em camundongos, no modelo de retirada da cauda, não é inibida pelo pré-tratamento dos animais com o EE da *H. ampla*;
- O EE da *H. ampla* é eficaz em inibir a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos;
- Os sistemas glutamatérgico, opióide (ação central), serotoninérgico e a via do óxido nítrico parecem, pelo menos em parte, contribuir para o efeito antinociceptivo causado pelo EE da *H. ampla*;
- O EE da *H. ampla* não causa déficit na performance motora no teste do “Rota-rod”, nem na atividade locomotora quando avaliada no teste do campo aberto em camundongos;
- O EE da *H. ampla*, na dose que produz antinocicepção, não exerce nenhum efeito sobre a aquisição e retenção da memória de curta e longa duração em ratas, no modelo de esquiva inibitória.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1: 9-19, 1987.

AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, 41: 309-321, 1990.

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

ARTIGAS, F., ROMERO, L., DE MONTIGNY, C., BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT<sub>1A</sub> antagonists. **Trends Neurosci.**, 19: 378-383, 1996.

BAHAR, A., DORFMAN, N., DUDAI, Y. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. **Eur J Neurosci.**, 19: 1111-1118, 2003.

BALICK, M.J., COX, P.A. Plants that Heal. In: **Plants, People, and Culture: the Science of Ethnobotany**. Scientific American Library, New York. p. 25-62, 1997.

BARDIN, L., LAVARENNE, J., ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, 86: 11-8, 2000.

BARON, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain - a clinical perspective. **Nat Clin Pract Neurol.**, 2: 95-106, 2006.

BASBAUM, A., JESSEL, T.M. The perception of pain. In **Principles of neural science**. McGraw-Hill, New York. p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A.I., FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci.**, 7 : 309-338, 1984.

BASBAUM, A.L. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv Exp Med Biol.**, 133: 177-189, 1981.

BAST, T., ZHANG, W.N., FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. **Hippocampus**, 13: 657-675, 2003.

BEIRITH, A., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, 924: 219–228, 2002.

BEIRITH, A., SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.**, 969: 110-6, 2003.

BELVISI, M.G., ROGERS D.F., BARNES, P.J. Neurogenic plasma extravasation: inhibition by morphine in guinea pig airways in vivo. **J Appl Physiol.**, 66: 268-272, 1989.

BENOLIEL, R., TANAKA, M., CAUDLE R.M., IADAROLA, M.J. Co-localization of *N*-methyl-D-aspartate receptors and substance P (neurokinin-1) receptors in rat spinal cord. **Neurosci Lett.**, 291: 61-64, 2000.

BERMAN, D.E., DUDAI, Y. Memory extinction, learning anew and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. **Science**, 291: 2417–2419, 2001.

BERNABEU, R., BEVILAQUA, L., ARDENGHI, P., BROMBERG, E., SCHMITZ, P., BIANCHIN, M., IZQUIERDO, I., AND MEDINA, J.H. Involvement of

hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 94: 7041–7046, 1997.

BEVILAQUA, L.R., KERR, D.S., MEDINA, J.H., IZQUERDO, I., CAMMAROTA. Inhibition of hippocampal JunN-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **Eur J Neurosci.**, 17: 897–902, 2003.

BHAVE, G., KARIM, F., CARLTON, S.M., GEREAU, IV R.W. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nat Neurosci.**, 4: 417– 423, 2001.

BIANCHETTI, A., NISATO, D., SACILOTTO, R., DRAGONETTI, M., PICERNO, N., TARANTINO, A., MANARA, L., ANGEL, L.M., SIMON, E.J. Quaternary derivatives of narcotic antagonists: stereochemical requirements at the chiral nitrogen for in vitro and in vivo activity. **Life Sci.**, 33: 415-418, 1983.

BLEAKMAN, D., ALT, A., NISENBAUM E.S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol.**, 17: 592-604, 2006.

BOXALL, S.J., BERTHEIE, A., TOLLE, T.R., ZIEGLGANSBERGER, W., URBAN, L. mGluR activation reveals a tonic NMDA component in inflammatory hyperalgesia. **Neuroreport**, 9: 1201–1203, 1998.

BROWN, D.R., GOLDBERG, L.I. The use of quaternary narcotic antagonists in opiate research. **Neuropharmacology**, 24: 181-191, 1985.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, 33: 179-89, 2000.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Editora Argos, Chapecó. p. 297-315, 2001.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **J Ethnopharmacol.**, 100: 131-134, 2005.

CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learn Mem.**, 11: 572–578, 2004.

CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R.M., ROSSATO, J.I., RAMIREZ, M., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiol Learn Mem.**, 84: 25-32, 2005.

CARLTON, S.M., ZHOU, S., COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, 790: 160-169, 1998.

CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids. **Curr Opin Pharmacol.**, 1: 52-56, 2001.

CARTER, G.T., SULLIVAN, M.D. Antidepressants in pain management. **Curr Opin Investig Drugs.**, 3: 454-458, 2002.

CASTELLANO, C., CESTARI, V., CIAMEI, A. NMDA receptors and learning and memory processes. **Curr Drug Targets**, 2: 273-283, 2001.

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., JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci.**, 24: 487- 517, 2001.

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

CODERRE, T.J., KATZ, J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52: 259-285, 1993.

CODERRE, T.J., VAN EMPEL, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with agents acting at allosteric-glycine and polyamine receptor sites. **Pain**, 59: 353-9, 1994.

COGGESHALL, R.E., CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res Rev.**, 24: 28-66, 1997.

COSTIGAN, M., BEFORT, K., KARCHEWSKI, L., GRIFFIN, R.S., D'URSO, D., ALLCHORNE, A., SITARSKI, J., MANNION, J.W., PRATT, R.E., WOOLF, C.J. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. **BMC Neurosci.**, 3: 16-33, 2002.

CRAIG, A.D., DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D., MELZACK, R. (eds) **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, Edinburgo. p.183-214, 1999.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int.**, 38: 107-125, 2001.

D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther.**, 72: 74, 1941.

DAVIES, S.N., LODGE, D. Evidence for involvement N-methylaspartate receptors in "wind-up" of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res.**, 424: 402-406, 1987.

DE BIASI, S., RUSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 85: 7820-7824, 1988.

DEVICHE, P. Affinity of naloxone and its quaternary analogue for avian central delta and mu opioid receptors. **Brain Res.**, 757: 276-279, 1997.

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar.** UNESP, São Paulo. p. 230, 1996.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M.J., DICKENSON, A. **The pharmacology of pain.** Springer-Verlag, Berlim. p.21-41, 1997.

DJOUHRI, L., LAWSON, S.N. A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Brain Res Rev.**, 46: 131-145, 2004.

DOSTROVSKY, J. O. Role of thalamus in pain. **Prog Brain Res.**, 129:245-245, 2000.

DUN, N.J., DUN, S.L., WU, S.Y., FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H.H.H.W., TSENG, L.F. Nitric oxide synthase IR in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord. **Neuroscience**, 54: 845-857, 1993.

ELIZABETISKY, E., COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J Ethnopharmacol.**, 51: 111-120, 1996.

FALKENBERG, M.B, SANTOS, R.J., SIMÕES, C.M.O.S. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento;** Editora da UFSC/Editora da Universidade (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Florianópolis/Porto Alegre. Cap.10, 1999.

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.

FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu Rev Neurosci.**, 14: 219-245, 1991.

FIELDS, H.L., BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R.(eds). **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, Edinburgo. p.243-257, 1999.

FINNERUP, N.B., JENSEN, T.S. Spinal cord injury pain-mechanisms and treatment. **Eur J Neurol.**, 11: 73-82, 2004.

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

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

GADOTTI, V.M., TIBOLA, D., PASZCUK, A.F., RODRIGUES, A.L.S., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res.**, 1093: 116-122, 2006.

GALLANTINE, E.L., MEERT, T.F. Attenuation of the gerbil writhing response by  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ -opioids, and NK-1, -2 and -3 receptor antagonists. **Pharmacol Biochem Behav.**, 79: 125-135, 2004.

GARRY, M.G., WALTON, L.P., DAVIS, M.A. Capsaicin-evoked release of IR calcitonin gene-related peptide from the spinal cord is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP. **Brain Res.**, 861: 208-219, 2000.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends Neurosci.**, 14: 60–67, 1991.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, 57: 683-706, 1995.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain Physician**, 8: 277-290, 2005.

GOTO, T., NAKAO, K., GUNJIGAKE, K.K., KIDO, M.A., KOBAYASHI, S., TANAKA, T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. **Neuropeptides**, 41: 25–31, 2007.

GOULD, T.J., MCCARTHY, M.M., KEITH, R.A. MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. **Behav Pharmacol.**, 13: 287-294, 2002.

GRAEBNER, I.B., MOSTARDEIRO, M.A., ETHUR, E.M., BURROW, R.A., DESSOY, E.C., MOREL, A.F. Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. **Phytochemistry**, 53: 955-959, 2000.

GRAEBNER, I.B., MOREL, A.F., BURROW, R.A., MOSTARDEIRO, M.A., ETHUR, E.M., DESSOY, E.C.M., SCHER, A. Diterpenos isolados de *Humirianthera ampla*. **Rev Bras Farmacogn.**, 12: 80-81, 2002.

GRIFFIS, C.A., COMPTON, P., DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs.**, 7: 297-312, 2006.

GURPREET, K.D., STEPHEN, S.G.F. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. **Pharmacol Therap.**, 111: 260-271, 2006.

HAINS, B.C., SAAB, C.Y., KLEIN, J.P., CRANER, M.J., WAXMAN, S.G. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. **J Neurosci.**, 24: 4832-4839, 2004.

HEALE, V., HARLEY, C. MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. **Pharmacol Biochem Behav.**, 36: 145-149, 1990.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen.** Basel, Stuttgart: Birkhäuser. p. 275, 1966.

HERRERO, J.F., LAIRD, J.M.A., LOPEZ-GARCIA, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog Neurobiol.**, 61: 169-203, 2000.

HLINAK, Z., KREJCI, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res.**, 131: 221-225, 2002.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv Exp Med Biol.**, 298: 3-16, 1991.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30: 103, 1987.

HUNT, S.P., MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Neuroscience.** 2: 83-91, 2001.

HYLDEN, J.L., WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol.**, 67: 313-6, 1980.

HYLDEN, J. L., WILCOX, G. L. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. **Life Sci.**, 33:789-795, 1983.

IBUKI, T., HAMA, A.T., WANG, X.T., PAPPAS, G.D., SAGEN, J. Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury

and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. **Neuroscience**, 76: 845-858, 1997.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.**, 68: 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M., VIANNA, M.R., BEVILAQUA, L.M.R. The inhibition of acquired fear. **Neurotox Res.**, 6: 175-188, 2004.

JAFFE, J.H., MARTIN, W.R. Opioid agonists and antagonists, in: Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Vol. 9, eds. A.G. GILMAN, T.W. RALL, A.S. NIES AND P. TAYLOR (Macmillan, New York) p. 485, 1990.

JANCSO, G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. **Exp Physiol.**, 77: 405-31, 1992.

JI, R.R., STRICHARSTZ, G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. **Science**, 252: 1-19, 2004.

JI, R.R., WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction on nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis.**, 8: 1-10, 2001.

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

KAPLAN, M.A., RIBEIRO, J., GOTTLIEB, O.R. Chemogeographical evolution of terpenoids in Icacinaceae. **Phytochemistry**, 30: 2671-2676, 1991.

KASTER, M.P., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res Bull.**, 67: 53-61, 2005.

KHOURY, G.F., CHEN, A.C.N., GARLAND, D.E., STEIN, C. Intraarticular morphine, bupivacaine, and morphine/bupivacaine for pain control after knee videoarthroscopy. **Anesthesiology**, 77: 263-266, 1992.

KIM, K.S., LEE, K.W., IM, J.Y., YOO, J.Y., KIM, S.W., LEE, J.K., NESTLER, E.J., HAN, P.L. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 103: 3908-3913, 2006.

KLINGER, M., FREISSMUTH, M., NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. **Cell Signal.**, 14: 99-108, 2002.

LEKAN, H.A., CARLTON, S.M., COGGESHALL, R.E. Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. **Neurosci Lett.**, 208: 147-150, 1996.

LEVINE, J.D., TAIWO, Y.O. Involvement of the  $\mu$ -opiate receptor in peripheral analgesia. **Neuroscience**, 32: 571-575, 1989.

LEWANOWITSCH, T., IRVINE, R.J. Naloxone methiodide reverses opioidinduced respiratory depression and analgesia without withdrawal. **Eur J Pharmacol.**, 445: 61- 67, 2002.

LEWANOWITSCH, T., WHITE, J.M., IRVINE, R.J. Use of radiotelemetry to evaluate respiratory depression produced by chronic methadone administration. **Eur J Pharmacol.**, 484: 303-310, 2004.

LIMA, L.M., GRAEBNER, I.B., MOREL, A.F., CARVALHO, J.T.C. Estudo da atividade anti-inflamatória da espécie *Humirianthera ampla*. **Anais do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.** v: único, p. 100, 2000.

LIN, H.C., KANG, B.H., WAN, F.D., HUANG, S.T., TSENG, C.J. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarii of rats. **Eur J Pharmacol.**, 407: 83-9, 2000.

LOESER, J. D., MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353: 1607-1609, 1999.

LOTSCH, J., GEISLINGER, G. Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? **Clin Pharmacokinet.**, 40: 485-499, 2001.

LUO, Z.D., CHAPLAN, S.R., SCOTT, B.P., CIZKOVA, D., CALCUTT, N.A., YAKSH, T.L. Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of a role in allodynia development. **J Neurosci.**, 19: 9201-9208, 1999.

LUO, Z.D., CHAPLAN, S.R., HIGUERA, E.S., SORKIN, L.S., STAUDERMAN, K.A., WILLIAMS, M.E., YAKSH, T.L. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. **J Neurosci.**, 21: 1868-1875, 2001.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, 25: 429-438, 2002.

MALAN, T.P., MATA, H.P., PORRECA, F. Spinal GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesiology**, 96: 1161-1167, 2002.

MALCANGIO, M., FERNANDES, K., TOMLINSON, D.R. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. **Br J Pharmacol.**, 125: 1625-1626, 1998.

MALEC, D., POLESZAK, E. Adenosine receptor ligands and dizocilpine-induced antinociception in mice. **Int J Neurosci.**, 115: 511-22, 2005.

MALMBERG, A.B., YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J Neurosci.**, 15: 2768-76, 1995.

MALMBERG, A.B., BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioural and neuroanatomical correlates. **Pain**, 76: 215-22, 1998.

MANARA, L., BIANCHI, G., FIOCCHI, R., NOTARNICOLA, A., PERACCHIA, F., TAVANI, A. Inhibition of gastrointestinal transit by morphine and FK 33-824 in the rat and comparative narcotic antagonist properties of naloxone and its *N*-methyl quaternary analog. **Life Sci.**, 31: 1271-1274, 1982.

MARTINS, M.A. Efeito da microinjeção de glicina na substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral de ratos em modelo de dor somática profunda. 2005. xv + 82f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2005.

MARVIZON, J.C., MCROBERTS, J.A., ENNES, H.S., SONG, B., WANG, X., JINTON, L., CORNELIUSSEN, B., MAYER, E.A. Two *N*-methyl-d-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. **J Comp Neurol.**, 446: 325–241, 2002.

MASON, P., GAO, K. Raphe magnus serotonergic neurons tonically modulate nociceptive transmission. **Pain Forum**, 7: 413-150, 1998.

MASON, P. Central mechanisms of pain modulation. **Curr Opin Neurobiol.**, 9: 436-441, 1999.

MEOTTI, F.C., LUIZ, A.P., PIZZOLATTI, M.G., KASSUYA, C.A.L., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **J Pharmacol Exp Ther.**, 316: 789–796, 2006.

MILLAN, M.J., COLPAERT, F.C. Opioid systems in the response to inflammatory pain: sustained blockade suggests role of  $\kappa$  but not  $\mu$ -opioid

receptors in the modulation of nociception, behaviour and pathology. **Neuroscience**, 42: 541-553, 1991.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.**, 57: 1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol.**, 66: 355-474, 2002.

MITCHELL, D., HELLON, R. F. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**, 197: 169-194, 1977.

MJELLEM, N., LUND, A., EIDE, P. K., STORKSON, R., TJOLSEN, A. The role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in spinal nociceptive transmission and in the modulation of NMDA induced behaviour. **Neuroreport**, 3: 1061-4, 1992.

MOALEM, G., TRACEY, D.J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Brain Res Rev.**, 51: 240-264, 2005.

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

NAIK, A.K., TANDAN, S.K., KUMAR, D., DUDHGAONKAR, S.P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Eur J Pharmacol.**, 530: 59-69, 2006.

NEUGEBAUER, V. Peripheral metabotropic glutamate receptors: fight the pain where it hurts. **Trends Neurosci.**, 24: 550-552, 2001.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod.**, 66: 1022-1037, 2003.

OZAWA, S., KAMIYA, H., TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.**, 54: 581-618,1998.

OZEK, W., RESIN, Y., GUNGOR, M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. **Life Sci.**, 72: 1943–1951, 2003.

PALECEK, J., NEUGEBAUER, V., CARLTON, S.M., IYENGAR, S., WILLIS, W.D. The effect of a kainate GluR5 receptor antagonist on responses of spinothalamic tract neurons in a model of peripheral neuropathy in primates. **Pain**, 111: 151–161, 2004.

PASTERNAK, G. W. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. **J Am Med Assoc.**, 259: 1362, 1988.

PEANA, A.T., RUBATTU, P., PIGA, G.G., FUMAGALLI, S., BOATTO, G., PIPPIA, P., De MONTIS, M.G. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sci.**, 78: 2471-2474, 2006.

PHAM, T., CARREGA, L., SAUZE, N., FUND, O., DEVAUX, C., PERAGUT, J.C., SAADJIAN, A., GUIEU, R. Supraspinal antinociceptive effects of mu and delta agonists involve modulation of adenosine uptake. **Anesthesiology**, 987: 459-464, 2003.

PHILLIPSON, D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, 56: 237-243, 2001.

PIETROVSKI, E.F., ROSA, K.A., FACUNDO, V.A., RIOS, K., MARQUES, M.C., SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 83: 90-9, 2006.

PLEUVRY, B.J., LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther.**, 71: 313-324, 1996.

POCKETT, S. Spinal cord sympathetic plasticity and chronic pain. **Anesth Analg.**, 80: 173-179, 1995.

PRAST H, TRAN MH, FISCHER H, PHILIPPU A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. **J Neurochem.**, 71: 266-73, 1998.

REICHERT, J.A., DAUGHTERS, R.S., RIVARD, R., SIMONE, D.A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**, 89: 221-227, 2001.

RIEDEL, W., NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol.**, 60: 404-15, 2001.

RODRIGUES, A.L.S., ROCHA, J.B.T., MELLO, C.F., SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in openfield and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.**, 79: 150–6, 1996.

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: 185-8, 2005.

RUSIN, K.I., JIANG, M.C., CERNE, R., RANDIC, M. Interactions between excitatory amino acids and tachykinins in the rat spinal dorsal horn. **Brain Res Bull.**, 30: 329-338, 1993.

SAKURADA, S.,ORITO, T., SAKURADA, C., SATO, T., HAYASHI, T., MOBARAKEH, J.I., YANAI, K., ONODERA, K., WATANABE, T., SAKURADA, T. Possible involvement of tachykinin NK1 and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. **Eur J Pharmacol.**, 434: 29-34, 2002.

SAKURADA, T., MATSUMURA, T., MORIYAMA, T., SAKURADA, C., UENO, S., SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and

ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 75: 115-21, 2003.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy.** Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm. p. 47, 2004.

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.

SANTOS, A.R., NIERO, R., FILHO, V.C., YUNES, R.A., PIZZOLATTI, M.G., DELLE MONACHE, F., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Med**, 61: 329-332, 1995.

SANTOS, A.R.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther.**, 289: 417-426, 1999.

SANTOS, A.R.S., GADOTTI, V.M., OLIVEIRA, G.L., TIBOLA, D., PASZCUK, A.F., NETO, A., SPINDOLA, H.M., SOUZA, M.M., RODRIGUES, A.L., CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, 48: 1021-34, 2005.

SATOH, M., MINAMI, M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. **Pharmacol Ther.**, 68: 343-364, 1995.

SAWYNOK, J. Purines in pain management. **Curr Opin CPNS Invest Drugs.**, 1: 27-38, 1999.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol Rev.**, 55: 1-20, 2003.

SAWYNOK, J., LIU, X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol.**, 69: 313–340, 2003.

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

SEGERDAHL, M., SOLLVEI, A. Adenosine and pain relief: a clinical overview. **Drug Dev Res.**, 45: 151–158, 1998.

SELTZER, Z., DUBNER, R., SHIR, Y. A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. **Pain**, 43: 205-18, 1990.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Editora da UFSC/Editora da Universidade (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Florianópolis/Porto Alegre. p. 1102, 1999.

SINGH, S., BANI, S., SINGH, G.B., GUPTA, B.D., BANERJEE, S.K., SINGH, B. Anti-inflammatory activity of lupeol. **Fitoterapia**, 68: 9-16, 1997.

SLEUMER, H. Icacinaceae. **Flora Malesiana**, 7:1–87, 1971.

SMULLIN, D.H., SKILLING, S.R., LARSON, A.A. Interactions between substance P, calcitonin gene-related peptide, taurine and excitatory amino acids in the spinal cord. **Pain**, 42: 93-101, 1990.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Anesth Analg.**, 76: 182-191, 1993.

SZALLASI, A., BLUMBERG, P.M. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Adv Pharmacol.**, 24: 123-55, 1993.

SZAPIRO, G., VIANNA, M.R., MCGAUGH, J.L., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CaMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. **Hippocampus**, 13: 53-58, 2003.

TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J. Neurosci.**, 11: 928-932, 1991.

TANDRUP, T., WOOLF, C.J., COGGESHALL, R.E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transaction of the rat sciatic nerve. **J Comp Neurol.**, 422: 172-180, 2000.

TEOH, H., MALCANGIO, M., BOWERY, N.G. GABA, glutamate and substance P-like immunoreactivity release: effects of novel GABAB antagonists. **Br J Pharmacol.**, 118: 1153-1160, 1996.

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

TJØLSEN A., HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J. (eds). **The Pharmacology of pain**, Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. p. 1-20, 1997.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacol. Ther.**, 109: 57–77, 2006.

URBAN, L., NAGY, I. Is there a nociceptive carousel? **Trends Pharmacol Sci.**, 18: 223- 224, 1997.

URCA, G., RAIGORODSKY, G. Behavioral classification of excitatory amino acid receptors in mouse spinal cord . **Eur J Pharmacol.**, 153: 211-220, 1988.

VALENTINO, R.J., KATZ, J.L., MEDZIHRADESKY, F., WOODS, J.H. Receptor binding, antagonist, and withdrawal precipitating properties of opiate antagonists. **Life Sci.**, 32: 2887-2896, 1983.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.**, 46: 295-309, 2004.

VARNEY, M.A., GEREAU, R.W. Metabotropic glutamate receptor involvement in models of acute and persistent pain: prospects for the development of novel analgesics. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.**, 1: 283-296, 2002.

VIANNA, M.R.M., SZAPIRO, G., MCGAUGH, J.L., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 98: 12251-12254, 2001.

VINADE, E.R., IZQUIERDO, I., LARA, D.R., SCHMIDT, A.P., SOUZA, D.O. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. **Neurobiol Learn Mem.**, 81: 137-43, 2004.

WALKER, K., REEVE, A., BOWES, M., WINTER, J., WOTHERSPOON, G., DAVIS, A., SCHMID, P., GASPARINI, F., KUHN, R., URBAN, L. mGlu5 receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. **Neuropharmacology**, 40: 10-19, 2001.

WAXMAN, S.G., CUMMINS, T.R., DIB-HAJJ, S., FJELL, J., BLACK, J.A. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, 22: 1177-1187, 1999.

WOOLF, C.J., SHORTLAND, P., REYNOLDS, M., RIDINGS, J., DOUBELL, T., COGGESHALL, R.E. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **J Comp neurol.**, 360: 121-134, 1995.

WOOLF, C.J., COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 96: 7723-7730, 1999.

WOOLF, C.J. Pain. **Neurobiol Dis.**, 7: 504-510, 2000.

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

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

XIAO, H.S., HUANG, Q.H., ZHANG, F.X., BAO, L., LU, Y.J., GUO, C., YANG, L., HUANG, W.J., FU, G., XU, S.H., CHENG, X.P., YAN, Q., ZHU, Z.D., ZHANG, X., CHEN, Z., HAN, Z.G., ZHANG, X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 99: 8360-8365, 2002.

YAKSH, T.L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. **Brain Res.**, 458: 319-324, 1988.

YAMAKURA, T., SHIMOJI, K. Subunit-and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog. Neurobiol.**, 59: 279-298, 1999.

ZHANG, X., BAO, L., SHI, T.J., JU, G., ELDE, R., HOKFELT, T. Down-regulation of  $\mu$ -opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, 82: 223-240, 1998.

ZHOU, L., ZHANG, Q., STEIN, C., SCHAFFER, M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurones to peripheral opioid analgesia. **J Pharmacol Exp Ther.**, 286: 1000-1006, 1998.

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