



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**GEÓRGEA VANESSA SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA AGREGATINA D ISOLADA DE  
*Sinningia aggregata* EM CAMUNDONGOS**

CURITIBA  
2014

**GEÓRGEA VANESSA SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA AGREGATINA D ISOLADA DE  
*Sinningia aggregata* EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof.Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA  
2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Souza, Geórgia Vanessa

Avaliação do efeito antinociceptivo da agregatina D isolada de *Sinningia aggregata* em camundongos. / Geórgia Vanessa Souza. – Curitiba, 2014.  
145 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Atividade antinociceptiva 2. Naftoquinona 3. Gesneriaceae I. Título  
II. Zamprônio, Aleksander Roberto III. Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.781

Aos meus pais Soeli e José Sérgio, ao meu marido Nilo e a minha pequena preciosidade, que me inspirou em não desistir, Maria Eduarda... Esta dissertação é um mérito nosso! Obrigada por estarem sempre ao meu lado! Amo muito vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

A toda minha família, pela compreensão, carinho e apoio.

Em memória de Aleksandro Simas por ter dado início aos estudos com a *Sinningia aggregata*.

Ao departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

Ao professor Dr. Aleksander Zampronio, pela dedicação e orientação.

A professora Maria Élide Stefanello e à doutoranda Maria Helena Verdan por terem contribuído em muito para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os professores do departamento, pelos ensinamentos.

Aos amigos João Luiz Ribas e Amanda Bastos pelo esforço em me ajudar.

Aos meus amigos do laboratório de Dor, febre e inflamação: Mariane, Haíssa, Luís, Diego e Tatiane pelo companheirismo e pela amizade que fizemos.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação.

*"Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência".*

*Augusto Cury*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais canais TRP envolvidos na sensibilização associada a dor inflamatória.....	<b>43</b>
--	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina em camundongos, intermediada por citocinas e indução final de prostanoídes (PG) e Aminas Simpáticas. ....	41
<b>Figura 2.</b> Cromatograma representativo do extrato etanólico de <i>S. aggregata</i> . ....	53
<b>Figura 3.</b> Efeito da administração local da Agregatina D (AgD) sobre a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos. ....	64
<b>Figura 4.</b> Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pelas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CINC-1 .....	66
<b>Figura 5.</b> Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pela bradicinina.....	68
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pela Prostaglandina E <sub>2</sub> e pela dopamina.....	70
<b>Figura 7.</b> Efeito do tratamento local com Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida por forskolina e DbAMPc. ....	72
<b>Figura 8.</b> Efeito do bloqueador de canais de potássio, glibenclamida, sobre o efeito antinociceptivo da Agregatina D (AgD).....	74
<b>Figura 9.</b> Efeito da Agregatina D (AgD) na liberação de NO por macrófagos peritoneais.....	76
<b>Figura 10.</b> Efeito da Agregatina D (AgD) no comportamento nociceptivo induzido pela aplicação da capsaicina, cinamaldeído, solução salina acidificada e mentol. ...	78



## LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos Excitatórios
AC	Adelinato Ciclase
AINEs	Antiinflamatórios Não-Esteroidais
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis a Ácidos
ATP	Adenosina Trifosfato
BK	Bradicinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CINC-1	Fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas-1
COX	Ciclooxigenase
COX1	Ciclooxigenase 1
COX2	Ciclooxigenase 2
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> Citosólica
DAG	Diacilglicerol
dbAMPc	dibutiril adenosina monofosfato cíclico
EESAg	Extrato bruto em etanol
EtOAc	Fração acetato de etila
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
HETES	Ácidos hidroxieicosatetraenóicos
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de Inositol
LPS	Lipolissacarídeo
LOX	Lipooxigenase
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolium
Na <sup>+</sup> <sub>v</sub>	Canal de Sódio Voltagem-Dependente
NGF	Fator de Crescimento Derivado do Nervo
NMDA	N-Metil D- Aspartato
NOS <sub>i</sub>	Óxido Nítrico Sintase Induzida
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PGs	Prostaglandinas

PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C
PKG	Proteína Kinase G
PLC	Fosfolipase C
SP	Substância P
SST	Trato Espinotálamico
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
TrKA	Receptor Tirosina Kinase A
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV <sub>1</sub>	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
TTX-R	Canais de Sódio Dependentes de Voltagem Resistentes à Tetrodotoxina
TTX-S	Canais de Sódio Voltagem-Dependentes Sensíveis à Tetrodotoxina
WDR	Neurônios de faixa dinâmica ampla

## RESUMO

Estudos anteriores desenvolvidos em camundongos demonstraram que o extrato bruto de *Sinningia aggregata* possui ação antinociceptiva na fase inflamatória do teste da formalina e na nocicepção induzida por carragenina. Analisando-se as frações obtidas desse extrato, demonstrou-se que parte dessa propriedade deve-se a presença de um novo composto heterocíclico, isolado da fração acetato de etila, denominado de Agregatina D. A Agregatina D quando localmente aplicada na pata dos animais nas doses de 0,7-7 ng, reduziu de maneira dose-dependente a nocicepção induzida pela carragenina (300 µg/pata), com inibição máxima de 66%. Sabe-se que a aplicação intra-plantar de carragenina induz a sensibilização dos nociceptores por meio da liberação de uma cascata de mediadores como a bradicinina (BK) e as citocinas Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e da quimiocina Quimioatraente para Neutrófilos induzido por Citocinas 1 (CINC-1), seguindo-se os mediadores finais: os prostanóides e as aminas simpáticas. Então, seguindo essa sequência de mediadores, este estudo teve como finalidade elucidar o provável alvo da ação antinociceptiva da Agregatina D, avaliando a sensibilização dos nociceptores por meio dos filamentos de von Frey (0,008 à 2 g). A Agregatina D (7 ng/pata) inibiu significativamente em 55, 59 e 59%, a nocicepção induzida respectivamente pelas citocinas TNF- $\alpha$  (1 pg/pata), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/pata) e CINC-1 (10 pg/pata). Em concordância com esses resultados houve redução significativa da nocicepção induzida pela BK (500 ng/pata, 84%), prostaglandina E<sub>2</sub> (100 ng/pata, 64%) e dopamina (3 µg/pata, 78%). Resultados similares foram encontrados com a dipirona (320 µg/pata), com inibições de 57% para a BK, 76% para a prostaglandina E<sub>2</sub> e 80% para a dopamina. Entretanto, diferentemente da dipirona, o composto na dose testada não modificou a nocicepção induzida pelo ativador da adelinato ciclase (forskolina, 1 µg/pata), nem pelo análogo do AMPc (o dibutiril adenosina monofosfato cíclico, dbAMPc, 5 µg/pata), indicando que sua ação ocorre provavelmente antes da ativação da via adelinato ciclase/AMPc nos nociceptores. Também observou-se que diferentemente da dipirona a ação antinociceptiva do composto não foi afetada pelo bloqueador seletivo de canais de potássio, a glibenclamida (80 µg/pata). Avaliou-se ainda se o efeito antinociceptivo da Agregatina D poderia estar relacionado com inibição da liberação de NO. Para tanto, macrófagos peritoneais dos camundongos foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com o composto (4-4000 ng/mL) mas a Agregatina D não modificou esta resposta. Por fim, avaliou-se o efeito do composto no comportamento nociceptivo induzido pela aplicação de ativadores dos canais iônicos TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASIC, respectivamente capsaicina (0,1nmol/pata), cinamaldeído (10 nmol/pata), mentol (2,4 µmol/pata) e ácido acético 2% em salina, pH 1,98 (20 µL/pata) e o composto também não modificou estas respostas. A Agregatina D possui importante ação antinociceptiva, pois inibiu a nocicepção induzida pela carragenina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1, BK, prostaglandina E<sub>2</sub> e dopamina. Acredita-se que sua ação seja entre a ativação do receptor acoplado à proteína G e a ativação da adenilato ciclase. Além disso, ela não parece atuar via inibição da atividade da proteína de translocação nuclear  $\kappa$ B, ativação de canais de potássio sensíveis à ATP ou através da interação com os principais canais iônicos envolvidos na nocicepção.

**Palavras-chave:** *Sinningia aggregata*; Gesneriaceae; nocicepção; naftoquinona; Agregatin D.

## ABSTRACT

### **EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF AGGREGATIN D *Sinningia aggregata* ISOLATED IN MICE.**

Previous studies developed in mice showed that the crude extract of *Sinningia aggregata* has antinociceptive action in the inflammatory phase of formalin test and carrageenan-induced nociception. Analyzing the fractions obtained from this extract, it was demonstrated that this property is due to the presence of a new heterocyclic compound, isolated from ethyl acetate fraction, called Aggregatin D. Aggregatin D locally applied in the mice paw at doses of 0.7 to 7 ng reduced dose-dependently the nociception induced by carrageenan, with maximum inhibition of 66%. It is known that intraplantar application of carrageenan induces sensitization of nociceptors through the release of a cascade of mediators such as bradykinin (BK), the cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and chemokine chemoattractant for neutrophils induced cytokine 1 (CINC-1), followed by final mediators: prostanoids and sympathetic amines. So, following this sequence of mediators, this study aimed to elucidate the probable target of antinociceptive Aggregatin D action, using von Frey monofilaments (0.008 - 2 g) to evaluate the sensitization of nociceptors. Aggregatin D (7ng/paw) significantly inhibited at 55, 59 and 59%, respectively, the nociception induced by TNF- $\alpha$  (1 pg/paw), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/paw) and CINC-1 (10 pg/paw). In agreement with these results there was a significant reduction of nociception induced by BK (500 ng/paw, 84%), prostaglandin E<sub>2</sub> (100 ng/paw, 64%) and dopamine (3  $\mu$ g/paw, 78%). Similar results were found with dypirone (320  $\mu$ g/paw), with 57% inhibition for BK, 76% for prostaglandin E<sub>2</sub> and 80% for dopamine. However, unlike dypirone, Aggregatin D did not modify the nociception induced by adenylyl cyclase activator (forskolin, 1  $\mu$ g/paw) or the analogue of cAMP (dibutyryl adenosine monophosphate cyclic, dbAMPc, 5  $\mu$ g/paw), indicating that their action probably occurs prior to activation of the adenylyl cyclase/cAMP pathway in nociceptors. Unlike dypirone, Aggregatin D antinociceptive action was not affected by selective potassium channels blocker, glibenclamide (80  $\mu$ g/paw). It was evaluated if the antinociceptive action of Aggregatin D could be related to inhibition of NO release. Peritoneal macrophages of mice were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and treated with the compound (4-4000 ng/mL) but Aggregatin D did not modify this response. Finally, we also analyzed the effect of Aggregatin D in the nociception induced by activating Transient Receptor Potential channels (TRP): capsaicin (0,1 nmol/paw, agonist TRPV1), cinnamaldehyde (10nmol/paw, TRPA1 agonist), menthol (2,4 mol/paw, TRPM8 agonist) and acidified saline (Acetic Acid 2% in saline, pH 1.98 in 20  $\mu$ L/paw, agonist ASIC) and the compound also did not modify this response. Our data shows that Aggregatin D possesses an important antinociceptive activity, since it inhibited the nociception induced by carrageenan, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1, bradykinin, prostaglandin E<sub>2</sub> and dopamine. However, the compound was ineffective in the hyperalgesia induced by forskolin and by dbcAMP, suggesting that its action is between the G-protein coupled receptor activation and the adenylate cyclase activation. Besides, Aggregatin D does not seem to act through the inhibition of protein  $\kappa$ B nuclear translocation, ATP sensitive potassium channel activation or interaction with the main ion channels involved in nociception.

**Keywords:** *Sinningia aggregata*; Gesneriaceae; Nociception; Naphtoquinone; aggregatin D

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Conceitos e Definições</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Transmissão da Resposta Nociceptiva</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 A Dor Inflamatória</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4 A Participação dos Receptores TRP na Hiperálgia Inflamatória</b> .....	<b>42</b>
<b>1.5 O Tratamento da Dor Inflamatória</b> .....	<b>44</b>
<b>1.6 A Importância dos Fitoterápicos e a <i>Sinningia Aggregata</i></b> .....	<b>47</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>50</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>50</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2 Material Botânico</b> .....	<b>51</b>
<b>3.3 Extração e Isolamento da Agregatina D</b> .....	<b>51</b>
<b>3.4 Drogas</b> .....	<b>54</b>
3.4.1 Soluções e tampões .....	<b>54</b>
3.4.1.1 Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS) .....	<b>54</b>
3.4.1.2 Solução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) 5 mg/mL.....	<b>55</b>
3.4.1.3 Meio de cultura RPMI 1640 .....	<b>55</b>
3.4.1.4 Solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS).....	<b>55</b>
3.4.1.5 Reagente de Griess.....	<b>55</b>
3.4.1.6 Solução de Turk .....	<b>56</b>
<b>3.5 Teste Comportamental para Avaliação da Hiperálgia Mecânica</b> .....	<b>56</b>
<b>3.6 Determinação da Dose Efetiva de Agregatina D</b> .....	<b>57</b>
<b>3.7 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D sobre a Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Bradicininina e pelas Citocinas TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> e CINC-1</b> .....	<b>57</b>
<b>3.8 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Prostaglandina E<sub>2</sub> e dopamina</b> .....	<b>58</b>
<b>3.9 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Hiperálgia Mecânica Induzida Pelo Dibutiril AMPc e Forscolina</b> .....	<b>58</b>
<b>3.10 Avaliação do Envolvimento de Canais de Potássio Sensíveis ao ATP no Efeito Antinociceptivo da Agregatina D</b> .....	<b>59</b>

<b>3.11 Efeito da Agregatina D Sobre a Liberação de NO por Macrófagos Peritoneais de Camundongos .....</b>	<b>59</b>
<b>3.12 Avaliação da Viabilidade Celular .....</b>	<b>60</b>
<b>3.13 Ensaio Para Dosagem do NO .....</b>	<b>60</b>
<b>3.14 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Nocicepção Induzida por Agonistas de TRPV<sub>1</sub>, TRPA<sub>1</sub>, TRPM<sub>8</sub> E ASIC<sub>3</sub> .....</b>	<b>61</b>
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>62</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Mecânica Induzida por Carragenina .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Induzida Pelas Citocinas TNF-<math>\alpha</math> , IL-1<math>\beta</math> e CINC-1.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) Sobre a Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Bradicinina.....</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) Sobre a Hiperálgia Mecânica Induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub> e Dopamina.....</b>	<b>69</b>
<b>5.5 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Forscolina e Pelo Dibutiril - Monofostato Cíclico de Adenosina .....</b>	<b>71</b>
<b>5.6 Efeito do Bloqueio de Canais de Potássio Sensíveis ao ATP Sobre o Efeito Antinociceptivo da Agregatina D (AgD) .....</b>	<b>73</b>
<b>5.7 Efeito da Agregatina D (AgD) Sobre a Liberação de NO por Macrófagos Peritoneais .....</b>	<b>75</b>
<b>5.8 Efeito da Agregatina D (AgD) Sobre A Nocicepção Induzida pela Ativação dos Canais TRPV<sub>1</sub>, TRPA<sub>1</sub>, TRPM<sub>8</sub> e ASIC<sub>3</sub> .....</b>	<b>77</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>110</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Conceitos e Definições

A dor é um dos mais importantes sintomas de muitos tipos de doenças, sendo uma experiência complexa, que envolve não somente a transdução do estímulo nocivo proveniente do meio externo, mas também o processamento afetivo e cognitivo pelo cérebro (SCHAIBLE & RICHTER, 2004). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), definiu em 1994 a dor como sendo *“Uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesão tecidual real ou potencial ou que é descrita em termos de tal lesão”* (LOESER & TREEDE, 2008). Sendo assim, a dor tem uma função adaptativa, com o intuito de alertar sobre uma lesão tecidual que ocorreu ou que poderá ocorrer caso o estímulo lesivo persista. Como exemplo, tem-se a dor aguda na pele que é ocasionada por temperaturas nocivas e que evoca uma rápida retirada motora, integrada via arco-reflexo no corno ventral da medula espinhal, como forma de descontinuar a exposição ao estímulo lesivo (MILLAN, 1999).

O termo nocicepção foi definido pela IASP como sendo *“o processo neural de codificação e processamento de um estímulo nocivo”*. A nocicepção é um fator essencial para a sobrevivência dos organismos em ambientes hostis, pois os mecanismos de transdução que envolvem o processamento nociceptivo, favorecem a defesa, no sentido de evitar aquilo que pode ser lesivo para os órgãos e tecidos (LOESER & TREEDE, 2008, JULIUS & BASBAUM, 2001). Enquanto a dor é um fenômeno subjetivo, a nocicepção é um fenômeno fisiológico, que está no centro de muitos estados dolorosos e que pode ser medido através de técnicas eletrofisiológicas (LOESER & TREEDE, 2008, SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

A dor nociceptiva é aquela proveniente da ativação dos nociceptores que estão localizados na pele, nas vísceras e também em outros órgãos (MILLAN, 1999, LOESER & TREEDE, 2008, SCHOLZ & WOOLF, 2002). Já a hiperalgesia é um termo usado para designar o aumento da sensibilidade à dor (LOESER & TREEDE, 2008). Na hiperalgesia, os neurônios periféricos tem sua responsividade aumentada, pois ficam sensibilizados de forma que podem deflagrar facilmente um potencial de ação ao permitir a entrada de íons sódio. Nesse caso, com a diminuição do limiar nociceptivo, o estímulo nocivo causa uma resposta à dor mais intensa (MILLAN

1999; LOESER & TREEDE, 2008; SCHOLZ & WOOLF, 2002). Os mecanismos moleculares que estão subjacentes à hiperalgesia inflamatória serão descritos pormenorizadamente adiante.

Sendo a dor uma função fisiológica decorrente da percepção de estímulos que podem causar lesão para nossos tecidos, ela deveria desaparecer após a cura da lesão e isso ocorre inúmeras vezes. No entanto, há casos em que, mesmo após a cura da lesão, a dor persiste (SCHOLZ & WOOLF, 2002). Nesses casos a transição de dor aguda para dor crônica envolve más adaptações no organismo, que ocorrem tanto na medula espinhal quanto no cérebro (JULIUS & BASBAUM, 2001). Na dor crônica não há uma relação causal entre dor e nocicepção, sendo que a dor não reflete necessariamente lesão tecidual, podendo sofrer influências tanto de fatores psicológicos como sociais (KENDALL, 1999). A dor crônica pode também ser o resultado da presença de uma doença crônica em que há persistência do processo nociceptivo, sendo que isso é frequentemente acompanhado por desregulação neuroendócrina, fadiga, disforia e deterioramento físico e até mesmo do desempenho mental (CHAPMAN, 1999). Por isso, a dor crônica, muito mais do que a dor aguda, continua sendo um dos maiores desafios para a prática clínica, pois frequentemente os tratamentos são inefetivos ou limitados por efeitos colaterais indesejáveis (LEVINSON et al., 2012).

A dor crônica também pode ser uma consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial, recebendo neste caso a denominação de “Dor Neuropática” (LOESER & TREEDE, 2008). A fisiopatologia da dor neuropática é diferente da dor nociceptiva aguda, pois nesta as fibras sensoriais estão intactas e os potenciais de ação são gerados somente quando ocorre estimulação dos nociceptores. Por outro lado na dor neuropática podem ocorrer disparos ectópicos mesmo na ausência de estimulação, induzindo ao aparecimento de dor espontânea (SCHAIBLE et al., 2011). Neste tipo de dor, as alterações decorrentes da deterioração dos neurônios sensitivos, geram mudanças nas sinapses no corno dorsal da medula espinhal, ocorrendo alterações duradouras na expressão de transmissores, de receptores e de canais iônicos, resultando em conexões sinápticas excitatórias aberrantes (WOOLF & SALTER, 2000). Essas alterações promovem plasticidade neuronal, ou seja, ocorre um progressivo aumento da resposta com a aplicação de um estímulo repetitivo culminando com o aparecimento

de dor persistente ou espontânea, que é acompanhada de hiperalgesia e/ou alodinia (MILLAN, 1999, SCHOLZ & WOOLF, 2002, WOOLF & SALTER, 2000).

A alodinia foi definida pela IASP (2008) como sendo um caso especial de hiperalgesia, em que ocorre dor como resposta a um estímulo não nociceptivo, como por exemplo, dor ao ser tocado suavemente com as mãos. Esses termos descrevem os estados de dor patológica, porém na terminologia recente, o termo alodinia não deve ser usado em modelos animais o termo alodinia, somente deve ser usado quando já se sabe que o teste não é capaz de ativar os nociceptores (MILLAN, 1999; LOESER & TREEDE, 2008).

Vários passos podem ser identificados para que ocorra o processamento de um estímulo nocivo conduzindo-o a experiência emocional de dor. Dentre as etapas que culminam com a percepção de dor estão: decodificação de diferentes modalidades de estímulos tais, como químico, físico ou mecânico em potenciais de ação, transmissão desses potenciais até o cérebro, modulação na medula espinhal e ações do sistema inibitório descendente (VANDERAH, 2007).

A primeira etapa envolve a percepção desses estímulos por um conjunto de receptores sensoriais presentes nos terminais periféricos. O nociceptor é um receptor sensorial que é capaz de traduzir e de codificar um estímulo nocivo (LOESER & TREEDE, 2008). O nociceptor compreende todo o nervo periférico e seus ramos, que se projetam até medula espinhal, atuando como um receptor sensitivo, onde ocorre a decodificação dos sinais que culminam com um potencial de ação (LOESER & TREEDE, 2008). Esses receptores sensoriais ou nociceptores não estão equipados com nenhum órgão ou corpúsculo especializado (como discos de Merkel ou corpúsculos pacinianos), mas respondem prontamente a uma variedade de estímulos nocivos. Quando a amplitude do estímulo for suficientemente alta, os nociceptores geram então potenciais de ação. Estes potenciais são conduzidos através dos axônios até a medula espinhal, local em que ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios em sinapses com neurônios secundários, que conduzem a informação para centros superiores, induzindo a interpretação de dor pelos circuitos mais elevados, como sistema límbico e córtex somato sensorial (LOESER E TREEDE, 2008, SCHAIBLE & RICHTER, 2004, VANDERAH, 2007).

Ao contrário dos outros tipos de receptores sensitivos, os nociceptores não sofrem adaptação quando são continuamente estimulados. Ao invés disso ocorrem

disparos repetitivos ou contínuos, o que pode contribuir para reduzir o limiar de ativação dos nociceptores, ou seja, eles ficam sensibilizados (VANDERAH, 2007).

A sensibilização dos nociceptores inclui a queda do seu limiar de ativação e um aumento na sua resposta supraliminar induzindo à hiperalgesia (LOESER E TREEDE, 2008, MILLAN, 1999). Como consequência disso, a dor torna-se desproporcionalmente mais severa quando comparada à intensidade do estímulo (COUTAUX et al., 2005).

## **1.2 Transmissão da Resposta Nociceptiva**

As fibras aferentes nociceptivas primárias são classificadas de acordo com seu diâmetro, velocidade de condução, grau de mielinização bem como pela responsividade a estímulos sensitivos de diferentes modalidades (térmico, mecânico ou químico) ou intensidades (nóxico ou inócuo) (MILLAN, 1999, JULIUS & BASBAUM, 2001, ZEILHOFER et al, 2012). Os corpos celulares destes neurônios primários da dor localizam-se nos gânglios da raiz dorsal, no gânglio trigêmio e no gânglio nodoso e seus axônios projetam-se para uma variedade de alvos periféricos, incluindo a pele e as vísceras (BAUTISTA et al., 2013).

Na substância cinzenta da medula espinhal, local aonde chegam as aferências dos nociceptores periféricos, as projeções encontram-se distribuídas preferencialmente nas camadas mais superficiais. Essa distribuição baseia-se na anatomia da substância cinzenta, que é dividida em dez lâminas, conhecidas como lâminas de Rexed (ZEILHOFER et al, 2010).

As fibras nociceptivas aferentes primárias do tipo C são as de menor diâmetro (0,3-1,5  $\mu\text{m}$ ) e não são mielinizadas. Por isso estas fibras possuem uma baixa velocidade de condução (0,4-2 m/s) (COUTAUX et al., 2005, JULIUS & BASBAUM, 2001). São ditas polimodais, pois respondem a diversos tipos de estímulos entre eles os estímulos térmicos, mecânicos e químicos. O tipo de resposta dessas fibras é dependente de um conjunto de receptores presentes na membrana dos nociceptores e de um perfil neuroquímico distinto que depende de dois grupos variantes de fibras tipo C: as peptidérgicas e as não-peptidérgicas (COUTAUX et al., 2005). Os principais transmissores das fibras peptidérgicas são a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), além dos aminoácidos excitatórios (AAE), principalmente o aspartato e o glutamato (MILLAN,1999). Este

grupo de fibras expressa o receptor acoplado a tirosina quinase que responde para fator de crescimento neural (NGF), uma neurotrofina produzida pelos fibroblastos, queratinócitos e pelas células de Schwann (COUTAX et al., 2005, SNIDER & McMAHON, 1998). Estudos confirmaram que o NGF é essencial para a manutenção da dor inflamatória, uma vez que ele induz um rápido aumento na produção de canais de sódio nos neurônios sensitivos, especificamente do subtipo  $Na_v1.7$ . E este canal está contundentemente envolvido com as vias de condução da dor, sendo altamente expresso nas fibras tipo C (LEVINSON et al., 2012). Além disso, as fibras peptidérgicas exercem importante papel na inflamação neurogênica, induzida pelos peptídeos vasoativos (SP e CGRP) (COUTAX et al., 2005).

O segundo grupo destas fibras, as não-peptidérgicas, não expressam SP ou o receptor acoplado a tirosina quinase, mas podem ser rotuladas seletivamente por ligarem-se ao carboidrato  $\alpha$ -D-galactosil lecitina IB4, além de possuírem receptores purinérgicos excitatórios ( $P_2X_3$ ) para a adenosina trifosfato (ATP). Este grupo de fibras depende da liberação do fator de crescimento derivado de células gliais, para que ocorra sua regeneração em caso de alguma lesão, bem como para induzir o brotamento das fibras, um fenômeno pertinente aos estados crônicos de dor (MILLAN, 1999, JULIUS & BASBAUM, 2001 ZEILHOFER et al., 2012, SNIDER & McMAHON, 1998).

Essas duas populações de fibras C diferem quanto à projeção anatômica para a medula espinhal. As fibras peptidérgicas projetam-se principalmente para a lâmina I do corno dorsal da medula, enquanto que os neurônios que ligam IB4 se projetam mais densamente para a lâmina II do corno dorsal da medula espinhal (SNIDER & McMAHON, 1998). Entretanto, é incerto se essa classificação neuroquímica para essas fibras representa classes funcionais distintas dos nociceptores, pois esse esquema de classificação ignora limitações específicas para cada marcador e sobreposições podem ocorrer. Um exemplo disso, é a co-expressão de dois marcadores numa mesma subpopulação de neurônios (GOLD & GEBHART, 2010). Além disso, uma característica única das fibras do tipo C, é a alta expressão dos canais de sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX-R) que ao contrário dos canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S), tem alto limiar de ativação e lenta cinética de inativação, contribuindo dessa forma para os estados de hiperalgesia prolongada (COUTAX et al., 2005). As fibras C são sensíveis tanto ao calor quanto à capsaicina, que é a substância pungente presente na pimenta e que atua como agonista do

receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), um canal iônico não seletivo (CATERINA et al., 1997). A participação desse tipo de canal na hiperalgesia inflamatória será descrita adiante.

Entretanto, CERVERO (1994), apontou que aproximadamente 10 a 20% das fibras C normalmente não respondem para estímulo nocivo agudo, mas sob condições inflamatórias ou de lesão tecidual elas passam a responder. Este grupo de fibras recebeu então a denominação de nociceptores silenciosos ou dormentes, e acredita-se que eles representem um caso especial de sensibilização (MILLAN, 1999).

As fibras do tipo A $\delta$  são pouco mielinizadas, de diâmetro médio (1-5  $\mu$ m) e com velocidade de condução intermediária (4-30 m/s). A nocicepção observada durante a ativação ds fibras A $\delta$  é nítida e bem localizada ( MEYER et al., 2006). Essas fibras são sensíveis tanto para estímulos mecânicos quanto para térmicos, sendo por isso subdivididas em três subgrupos: A-MHI, AM-HII e AM (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010). As do subtipo A-MHI são ativadas por estímulos mecânicos e por temperaturas superiores a 53°C e são insensíveis à capsaicina. As fibras do subtipo A-MHII inervam a pele não glabra e são ativadas por temperaturas entre 43 e 47°C e por capsaicina. Em humanos, essas fibras estão envolvidas com o desenvolvimento da dor primária, uma vez que elas são ativadas mais rapidamente quando comparado as fibras A-MHI. Já, o subtipo de fibras AM é insensível a temperaturas nocivas e à capsaicina, sendo ativadas somente por estímulos mecânicos de alta intensidade (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010).

As fibras do tipo A $\delta$  projetam-se para uma camada mais profunda do corno nervoso dorsal da medula (camada IV) e inervam aproximadamente 10% da pele, sendo que quando ativadas evocam sensação rápida de dor, que é de natureza cortante quando comparado a dor proveniente da estimulação das fibras do tipo C, que em geral é uma dor mais latejante ou difusa (MILLAN, 1999, JULIUS & BASBAUM, 2001). A ativação das fibras A $\delta$  promove a liberação dos peptídeos SP e do CGRP e também dos AAE nas sinapses do corno dorsal da medula (VISHWANATH & MUKHERJEE, 1996; AKERMAN et al., 2003).

Por outro lado, as fibras A $\alpha$  e A $\beta$  são as mielinizadas, de maior diâmetro e de rápida velocidade de condução (30-100 m/s) (MILLAN, 1999). Essas fibras são ativadas por estímulos mecânicos de baixa intensidade (ou inócuos) que são

aplicados na pele, nos músculos e nas articulações e então elas não contribuem para a percepção da dor (ZEILHOFER et al., 2012; JULIUS & BASBAUM, 2001).

Além da função sensitiva e protetora, as fibras nociceptivas podem exercer também função eferente, ou seja, quando elas são estimuladas por lesão tecidual elas promovem disparos antidrômicos, que culminam com a liberação de peptídeos e de outras substâncias que promovem várias respostas no local lesionado e também próximo a sua vizinhança (MILLAN, 1999, SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Os principais peptídeos liberados são a SP e o CGRP, que atuam localmente induzindo os sinais iniciais da inflamação como vasodilatação, extravasamento plasmático, adesão dos leucócitos ao endotélio vascular, atração dos macrófagos para o local, além de degranulação dos mastócitos (BOOLELL & TOOKE, 1990, DONNERER & AMANN, 1993, HE et al., 1990, HOLZER, 1988, MANTYH et al., 1989). Esses efeitos são decorrentes da interação dos nociceptores com as células do sistema imune, com as terminações nervosas simpáticas, com a parede dos vasos sanguíneos e outros tecidos. Essa inflamação produzida pelos nociceptores é chamada de inflamação neurogênica e pode exercer algum papel benéfico, como por exemplo, combatendo a infecção no local e podendo acelerar os mecanismos de cicatrização (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996, HOLZER, 1988, MAGGI, 1991 a e b). Esse papel fisiológico tem o intuito de realçar o fluxo sanguíneo local, melhorando o aporte de oxigênio e contribuindo para a manutenção da integridade tecidual, como exemplo no remodelamento ósseo e dentário (KRUGER, 1988).

Para compreendermos o papel das fibras nociceptivas na transmissão central da nocicepção é necessário levar em consideração mecanismos de transdução intracelulares, que alteram o fluxo iônico através da membrana neuronal por meio de segundos mensageiros (MILLAN, 1999, VANDERAH, 2007, GOLD & GEBHART, 2010). Então, a ativação das fibras nociceptivas desencadeia a liberação de SP, CGRP e de AAE nas sinapses do corno dorsal da medula, resultando em ativação dos neurônios de projeção (MILLAN, 1999, VANDERAH, 2007, GOLD & GEBHART, 2010). Estes são os responsáveis por conduzir os impulsos nociceptivos provenientes da periferia para regiões supra-espinhais responsáveis pela interpretação sensorial e emocional de dor.

A SP é um decapeptídeo pertencente à família taquicinina de peptídeos, atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso central (MUÑOZ & COVEÑAS, 2014). Este peptídeo promove seus efeitos mediante a

interação com receptores acoplados a proteína G do subtipo NK<sub>1</sub> (MUÑOZ & COVEÑAS, 2014). Então a ativação do receptor NK<sub>1</sub> pela SP, promove a ativação da fosfolipase C e liberação de segundos mensageiros, como o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP3) (MAGGI & SCHAWARTZ, 1997; MANTYH et al., 1997). Já o CGRP atua em seus receptores acoplados à proteína G (CGRP<sub>1</sub>/CGRP<sub>2</sub>), promovendo a liberação de monofostato cíclico de adenosina (AMPC) que é um segundo mensageiro potencialmente hiperalgésico (EDVINSSON et al., 1997; CUNHA et al., 1999).

Como acima mencionado, as fibras nociceptivas quando ativadas liberam AAE nessas sinapses, sendo que o principal neurotransmissor excitatório rápido das sinapses espinhais é o glutamato (ZEILHOFER, 2005). Esse aminoácido está distribuído em todos os circuitos do sistema nervoso e também co-localizado com os seus receptores em diferentes áreas cerebrais, sendo encontrado também periféricamente (GOUDET et al., 2009). Portanto, por ser encontrado tanto no sistema nervoso central como a periferia, o glutamato está envolvido tanto na indução da dor bem como pela sua transmissão ao sistema nervoso central (WOSNIAK, 2012). Nas sinapses do corno dorsal da medula espinhal, em resposta a um estímulo nociceptivo agudo, inicialmente ocorre a ativação dos receptores ionotrópicos para o glutamato. Esses receptores são representados pelo receptor para- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e o receptor cainato, que atuam de maneira muito ágil, com cinética extremamente rápida e a sua ativação resulta em rápida despolarização sob a ordem de poucos milésimos de segundos (MILLAN, 1999). Por isso, esses receptores estão envolvidos com a resposta nociceptiva aguda (MORRIS, 1989, LONG et al., 1990, DICKENSON & SULLIVAN, 1990, AULT & HILDEBRAND, 1993). Quando ativados periféricamente, esses receptores contribuem para induzir sensibilização após lesão (BARDONI, 2013). Após a ativação dos receptores ionotrópicos AMPA e cainato nas sinapses do corno dorsal da medula em resposta a um estímulo nocivo, ocorre a subsequente ativação dos receptores do tipo NMDA (N-Metil D- Aspartato) para o glutamato e dos receptores acoplados a proteína G tanto do glutamato (mGluR) quanto de outros moduladores ou neurotransmissores, como da SP (NK<sub>1</sub>), que geram uma onda de despolarização mais lenta, que pode durar mais do que dez segundos (MILLAN, 1999).



As transmissões sinápticas entre os neurônios nociceptivos e os neurônios de projeção localizadas no corno dorsal da medula estão sob a influência de interneurônios locais (excitatórios ou inibitórios), além das células gliais (ZEILHOLFER, 2012, BARDONI et al., 2013).

Esses neurônios controlam a transferência da informação sensorial de nocicepção proveniente da periferia por facilitação ou inibição da transferência de informações inter e intra-laminar (ZEILHOFER et al., 2010). Muitas diferentes classes de interneurônios tem sido identificadas, e eles mostram um variado padrão de co-localização de neurotransmissores e neuropeptídeos (MILLAN, 1999). Os principais neurotransmissores liberados pelos interneurônios inibitórios são a glicina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a acetilcolina e peptídeos opióides. Além disso, a maioria desses interneurônios da raiz dorsal na medula (ou neurônios secundários) são glutamatérgicos, assim como as suas conexões córtico-espinhais (WOZNIAK et al., 2012). Muitos desses interneurônios são alvos diretos das fibras C e A $\delta$  (WILLIS & WESTLUND, 1997). Isso sugere que as fibras C e A $\delta$  exercem um papel contra-regulatório na excitação dos neurônios de projeção. Conseqüentemente, a dor evocada pela excitação direta dos neurônios de projeção pelas fibras C e A $\delta$  pode ser limitada pela estimulação dos interneurônios inibitórios ou facilitada pelos interneurônios excitatórios.

A maior parte dos receptores para os neurotransmissores inibitórios liberados pelos interneurônios é acoplado a proteína G, sendo que as suas ações podem resultar na inibição da adelinato ciclase (AC), com conseqüente diminuição das correntes de Ca<sup>2+</sup> e aumento nas correntes de K<sup>+</sup>, causando hiperpolarização da membrana e diminuindo a liberação de outros neurotransmissores (MILLAN, 1999). Outros, como é o caso dos interneurônios glicinérgicos/gabaérgicos exercem a sua atividade através de receptores acoplados a um canal de Cl<sup>-</sup>, sendo que os receptores do GABA<sub>A</sub> são encontrados em quase todo o sistema nervoso central dos mamíferos, enquanto os receptores de glicina tem um padrão de distribuição mais restrito, podendo ambos exibir sobreposição de funções na medula espinhal (ZEILHOLFER, 2012).

Como já mencionado, os neurônios de projeção são responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva das sinapses na medula espinhal, através de várias estações relé para as regiões supra-espinhais, incluindo a área parabraquial lateral, a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e para o tálamo, favorecendo a

consciência da dor (BRAZ et al., 2014, ZEILHOLFER et al., 2005, ZEILHOLFER, 2012). Muitos tipos de neurônios de projeção são encontrados no corno dorsal da medula e eles são mais proeminentes nas camadas superficiais, respondendo portanto, especificamente para diferentes modalidades e intensidades de estímulos nociceptivos (BRAZ et al., 2014). Entretanto, nas lâminas mais profundas, esses neurônios respondem tanto a estímulos nociceptivos, quanto para estímulos não-nociceptivos, sendo por isso denominados de neurônios de faixa dinâmica ampla (WDR do inglês *Wide-dynamic-range*). Esses neurônios possuem como característica o disparo graduado de potenciais de ação, dependendo da intensidade dos estímulos (D'MELLO & DICKENSON, 2008). A sensibilização destes neurônios por um estímulo nociceptivo prolongado, também está envolvida com os estados de manutenção da dor prolongada, seja ela inflamatória ou neuropática (MILLAN, 1999).

A neuroanatomia e organização dessas projeções ascendentes da dor são complexas (ALMEIDA & LIMA, 1997). Há evidências convincentes de que tanto os neurônios não-seletivos (os neurônios WDR) como os neurônios com características nociceptivas possuem níveis similares de projeção no procencéfalo (LIGHT, 1992, WILLIS & WESTLUND, 1997).

A via do SST é uma das principais vias de conexão com os circuitos corticais, envolvendo a propagação de estímulos nocivos e também inócuos, relacionados com as sensações de dor pelo frio, pelo calor, por pressão mecânica (ALMEIDA et al., 2004, WILLIS & WESTLUND, 1997). O SST se origina de células localizadas nas ampliações lombares e sacrais, concentrando-se predominantemente na zona marginal do corno dorsal (lâmina I) e também nas lâminas IV a VI (WILLIS & WESTLUND, 1997). A maioria de seus neurônios cruza transversalmente a comissura anterior branca da medula espinhal, e ascende via funículo lateral contralateral para o tálamo medial e lateral. A projeção para o tálamo lateral está envolvida com o aspecto sensorial e discriminativo da dor como por exemplo, sua duração, localização e intensidade. Já, a sua projeção medial por intermédio de conexões com o córtex cingulado anterior, insula e córtex pré-frontal está envolvida com o componente afetivo da dor (SCHAIBLE & RICHTER, 2004, MILLAN, 1999). No entanto, quando o SST passa pelo tronco cerebral, ele origina diversos ramos colaterais destinados para a formação reticular da medula, para a ponte e para o mesencéfalo, incluindo os núcleos gigantocelular, paragigantocelular e para

a PAG (WILLIS & WESTLUND, 1997, ALMEIDA et al., 2004). Estas estruturas são responsáveis pela ativação do sistema depressor descendente, além de também estarem envolvidas com a resposta comportamental e neurovegetativa desencadeada para a dor (ZANGH et al., 1990, MILLAN, 1999).

As outras vias de projeção, igualmente a do SST são predominantemente contralaterais (com exceção das vias polissinápticas espinocervical e a da coluna dorsal pós-sináptica), e estão integradas entre si de forma que podem interagir mediante uma complexa rede de inervação, podendo também ativar as estruturas envolvidas com a supressão descendente (MILLAN, 1999, OSSIPOV et al., 2010). Além disso, como é o caso da via do trato espinomesencefálico, ocorre também integração com funções autonômicas, como por exemplo com o sistema cardiovascular proveniente da conexão com o núcleo parabraquial, ou com o sistema endócrino proveniente de conexões com o hipotálamo (ALMEIDA et al., 2004).

O tálamo é a principal estação alvo das aferências nociceptivas que são encaminhadas para estruturas corticais e subcorticais para que ocorra a decodificação da informação nociceptiva, interpretação do padrão temporal do estímulo, bem como sua localização topográfica (TRACEY & MANTYH, 2007).

Porém, estudos eletrofisiológicos, anatômicos, de imagem e do metabolismo cerebral, sugerem a existência de uma região “matrix” para a dor, em áreas cerebrais que são consistentemente ativadas por estímulos nocivos (OSSIPOV et al., 2010, TRACEY & MANTYH, 2007). Essas áreas apresentaram contrastantes padrões de resposta, dependendo do tipo de estímulo (MILLAN, 1999). Tais regiões, incluem a área somatosensorial do giro pós-central, a área somatosensorial I e II, várias regiões do córtex inferior e córtex parietal inferior, córtex cingular anterior, córtex insular e córtex medial pré-frontal. Estas regiões são intensamente interligadas entre si e com com regiões límbicas e motoras, como amígdala, estriado, hipotálamo, núcleo accumbens, núcleo parabraquial, hipotálamo e hipocampo. A união coordenada dessas conexões resulta na interpretação emocional dada para a dor, bem como a atenção dada a ela, a capacidade de tolerância e sua racionalização (BESSON et al., 1995). Então, um conjunto de regiões cerebrais está envolvido com diferentes respostas comportamentais com relação a um estímulo nocivo, incluindo influências do estado emocional, do grau de ansiedade, de experiências passadas, memórias e de muitos outros fatores que

podem realçá-la ou diminuí-la (OSSIPOV et al., 2010). Isso torna a experiência da dor altamente variável entre os indivíduos, pois não existe uma correlação direta entre a ativação dos nociceptores e a experiência sensorial de dor. Deste modo, a interpretação dessa experiência emocional e sensorial depende de vias específicas de projeção das sub-regiões medulares para centros específicos no tronco cerebral e na região cortical.

As sinapses do corno dorsal da medula espinhal também estão sob influência de fibras descendentes, provenientes das projeções supra-espinhais, que igualmente às ações modulatórias dos interneurônios, podem facilitar ou inibir a transferência dos *inputs* periféricos (MILLAN, 2002). Os principais núcleos que dão origem a essas vias descendentes estão localizados no hipotálamo, no núcleo parabraquial, no núcleo do trato solitário, no bulbo rostroventromedial e na PAG, sendo que estes núcleos podem estar interligados, antes de enviarem suas projeções para a lâmina I na medula (MILLAN, 2002, OSSIPOV et al., 2010). Essas vias descendentes originadas das regiões supra-espinhais e que se projetam para a medula espinhal são extremamente complexas e por não serem o foco principal deste estudo não serão descritas aqui em detalhes. Excelentes revisões sobre este assunto podem ser encontradas em MILLAN (2002) e OSSIPOV et al. (2010).

### **1.3 A Dor Inflamatória**

Apesar de a dor nociceptiva ter uma forte conotação adaptativa, a lesão ocasionada concomitantemente a um estímulo nociceptivo agudo ou persistente, pode, com frequência, desencadear o aparecimento de um processo inflamatório, que tem como objetivo a remoção do agente lesivo, bem como favorecer a regeneração tecidual (LINLEY et al., 2010).

A palavra inflamação (do latim, *inflammare*, que significa "em chamas"), foi inicialmente descrita pelo enciclopedista romano, Cornelius Celsius, que definiu os sinais cardinais da inflamação como vermelhidão e inchaço, com aparecimento de calor e dor no local lesionado (FERRERO-MILIANI et al., 2006). Hoje, entretanto, acredita-se que a inflamação é parte de uma resposta de defesa não específica e que seus sinais iniciais são decorrentes de uma série de alterações vasculares e teciduais, que culminam com o fluxo sanguíneo aumentado no local, com elevação do metabolismo celular, vasodilatação, liberação de mediadores solúveis,

extravasamento de fluidos e recrutamento de células para o local (FERRERO-MILIANI et al., 2006).

Toda essa resposta é desencadeada por uma ampla gama de mediadores, que são sintetizados e liberados pelas células do sistema imune atraídas para o local, bem como pelas células residentes e também por outras células, pelas plaquetas e pelas terminações nervosas (LOYD et al., 2013). Esses mediadores podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória por estimularem diretamente os nociceptores ou indiretamente por promoverem a sua sensibilização para outros estímulos, tendo como consequência o aparecimento da hiperalgesia e da alodinia, anteriormente descritas (PETHO & REEH, 2012, SCHAIBLE et al., 2011). Além disso, a inflamação pode promover o recrutamento dos nociceptores silenciosos, como anteriormente descrito (GOLD & GEBHART, 2010, SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

Dentre os mediadores liberados durante o processo inflamatório, que são potencialmente algogênicos, inclui-se a bradicinina, o ATP, a histamina, a SP e também a serotonina (LINLEY et al., 2010). Outros como, o NO, fatores neurotróficos, prótons, proteases, citocinas, quimiocinas, prostaglandinas (PGs) e aminas simpáticas, contribuem para o aparecimento da hiperalgesia, que é um dos principais sintomas da dor inflamatória (PETHO & REEH, 2012, MILLAN, 1999, JULIUS & BASBAUM, 2001, McMAHON et al., 2006, SCHAIBLE et al., 2011). Além disso, existem mediadores que podem concomitantemente ativar e sensibilizar os nociceptores, sendo a bradicinina, um dos exemplos mais conhecidos. A seguir, faremos uma breve descrição de cada um desses mediadores.

A bradicinina é um nonapeptídeo sintetizado tanto intra quanto extravascularmente, a partir de proteínas precursoras, chamadas de cininogênios, pela ação da enzima proteolítica denominada calicreína (MIZUMURA et al., 2009, PETHO & REEH, 2012). A calicreína plasmática é derivada da pré-calicreína que é formada quando o fator de coagulação de Hageman (fator XII) é ativado pelo contato com superfícies carregadas negativamente, ou sob condições de lesão ou inflamação (CALIXTO et al., 2000, PETHO & REEH, 2012). Além da bradicinina, outras cininas são produzidas nos tecidos a partir dos cininogênios, como a calidina bem como os produtos descarboxilados gerados pela ação da enzima cininase I, que são a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina, ambos produzidos a partir da bradicinina e da calidina, respectivamente (CALIXTO et al., 2000, PETHO & REEH, 2012). Em

humanos, quando administrada por injeção ou por iontoforese, a bradicinina causa dor de maneira dose-dependente (PATERSON et al., 2013).

A ação nociceptiva aguda induzida pela bradicinina deve-se a sua capacidade de despolarizar e ativar diretamente os neurônios nociceptivos (MIZUMURA & KUMAZAWA, 1996). As evidências apontam que o efeito excitatório direto da bradicinina depende da interação com os receptores B<sub>2</sub> constitutivamente expressos nas fibras nociceptivas (PETHÕ & REEH, 2012). Um exemplo dessa via de sinalização, é a que depende da ativação da proteína Gq, liberando como segundos mensageiros, o IP<sub>3</sub> e o DAG. O IP<sub>3</sub> induz a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, favorecendo então a liberação dos peptídeos e dos AAE nas sinapses do corno dorsal da medula (MIZUMURA et al., 2009). O DAG promove a ativação da PKC que pode fosforilar vários canais iônicos, culminando com a liberação da SP e do CGRP nas sinapses da raiz dorsal na medula espinhal (BARBER & VASKO, 1996, GUTOWSKI et al., 1991, PETHÕ & REEH, 2012). O aumento de Ca<sup>2+</sup> produzido pela bradicinina também pode promover a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, que retira o ácido araquidônico dos fosfolípidios de membrana (BURGESS et al., 1989, GAMMON et al., 1989, THAYER et al., 1988). A importância dos derivados do ácido araquidônico na sensibilização dos nociceptores será descrita mais adiante.

Os efeitos excitatórios induzidos pela bradicinina nas fibras nociceptivas sofrem rápido declínio em resposta a aplicações subsequentes, feitas em curtos intervalos de tempo (menos do que 10 min), sugerindo que os receptores B<sub>2</sub> sofrem taquifilaxia com perda de sensibilidade (MIZUMURA et al., 2009). Porém, os produtos da descarboxilação enzimática das cininas, a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina são agonistas seletivos do receptor B<sub>1</sub>, que é tipicamente induzível, favorecendo a manutenção da hiperalgesia inflamatória (PETHO & REEH, 2012). Este receptor está amplamente suprarregulado nas condições de lesão tecidual, inflamação e lesão de nervo, como resultado de transcrição gênica aumentada seguida de síntese proteica, sendo mediado por citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF-α) e a Interleucina - 1 beta (IL-1β) (CAMPOS et al., 1999, PETHO & REEH, 2012).

Em camundongos a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina produzida entre 3 e 5 h depois de sua aplicação na superfície plantar, foi mediada predominantemente pelos receptores B<sub>2</sub> da bradicinina. Entretanto, depois desse

período houve maior envolvimento dos receptores  $B_1$ , sugerindo sua indução por outros mediadores liberados localmente (CUNHA et al., 2007). Além disso, a bradicinina também promove ações sensibilizadoras indiretas que são mediadas pelos canais catiônicos de potencial transitório (TRP), contribuindo para os acontecimentos que delineiam a hiperalgesia inflamatória (STUCKY et al., 2009). Essas ações dependem da produção de segundos mensageiros intracelulares que são induzidos pela ativação dos receptores da bradicinina, conforme exemplificado mais adiante. Portanto, a bradicinina figura entre os principais mediadores nociceptivos.

Como já mencionado anteriormente, a substância P é um decapeptídeo que age em receptores  $NK_1$  expressos em vários tecidos (MUÑOZ & COVEÑAS, 2014, SAMSAM et al., 2000). Embora, seja encontrada em aproximadamente 20% dos neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinhal, a SP não é um peptídeo restrito aos nociceptores, podendo ser encontrado também em outros tipos celulares, como células do sistema imune, fígado, placenta, pulmão, bem como em líquidos corporais como sangue e fluido cerebro-espinhal (LEVINE et al., 1993, MUÑOZ & COVEÑAS, 2014). Isto o torna ubíquo no organismo dos mamíferos no qual representa um elo de ligação entre o sistema imune e o sistema nervoso por meio de ações autócrinas, parácrina e/ou endócrinas (MUÑOZ & COVEÑAS, 2014).

A fonte universal de energia celular, o ATP, é liberado por meio de disparo antidrômico das fibras nociceptivas ou juntamente com íons prótons das células lesionadas durante a resposta inflamatória, mediante um estímulo nociceptivo, e pode ativar diretamente as fibras nociceptivas (AOYAMA et al., 2010; KHAKH & NORTH, 2006). Tal efeito, depende da interação com canais iônicos do subtipo  $P_2X_3$ , expressos unicamente nas fibras periféricas de menor diâmetro não peptidérgicas, sendo que a ativação desses canais aumenta a liberação dos neurotransmissores excitatórios (BURNSTOCK, 2000). Adicionalmente, o ATP contribui também tanto para a sensibilização central quanto para a sensibilização periférica, que estão subjacentes aos processos patológicos de dor, por efeitos modulatórios em diversos canais e receptores (FABRETTI, 2013). Outra maneira de justificar a importância do ATP na sensibilização da dor inflamatória é por meio da sua interação com receptor acoplado a proteína G, do subtipo  $P_{2Y}$ , gerando segundos mensageiros que intensificam as respostas celulares ao estimularem o influxo de  $Ca^{2+}$ , via ativação da fosfolipase C (AOYAMA et al, 2010, KHAKH &

NORTH, 2006, CHEN et al., 1995). Além disso, nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, os subtipos de receptores ionotrópicos  $P_2X_2$  e  $P_2X_3$  formam canais heteromultiméricos que são dessensibilizados mais lentamente, quando comparados a suas formas homoméricas, o que contribui para a cronicidade da hiperalgesia, sendo que outros mediadores tais como a prostaglandina  $E_2$ , contribuem para a manutenção do influxo iônico sustentado por esses canais durante os estados inflamatórios (BLAND-WARD & HUMPHREY, 1997, SANSUM et al., 1997, MILLAN, 1999, WANG et al., 2007).

Outro mediador envolvido na dor inflamatória que pode ativar e também sensibilizar os nociceptores é a histamina. A histamina derivada dos mastócitos é um componente familiar da resposta inflamatória, evocando geralmente maior sensação de coceira do que de dor (MILLAN, 1999, ROSA & FANTOZI, 2013). No entanto, quando em contato com a histamina, as fibras aferentes primárias liberam SP e CGRP que como explicado anteriormente, promovem ativação dos nociceptores por realçarem a liberação de segundos mensageiros, que induzem hiperalgesia, via ativação da fosfolipase C e da AC, respectivamente. Os efeitos diretos da ativação da histamina nas fibras aferentes primárias são dependentes de seus receptores  $H_1$ , que estão positivamente acopladas à fosfolipase C e aumento secundário do  $Ca^{2+}$  intracelular (YOSHIDA et al., 2005).

A serotonina é um neurotransmissor que tem grande importância em vários estados de dor aguda e persistente. Há relatos na literatura de que a inflamação induz ao aumento periférico nos níveis de serotonina e que quando aplicada diretamente em animais e em humanos, ela evoca nocicepção, coceira e hiperalgesia (LOYD et al., 2013). O efeito nociceptivo direto desencadeado pela serotonina deve-se a ativação do receptor ionotrópico, do subtipo 5-HT<sub>3</sub>, que quando ativado promove a liberação do CGRP nas sinapses do corno nervoso dorsal na medula espinhal (LOYD, et al., 2013). A indução da hiperalgesia pela serotonina envolve a ativação de outros subtipos de receptores expressos nos terminais sensitivos, como por exemplo, o subtipo 5-HT<sub>2</sub>, que está acoplado a proteína Gq, induzindo a um incremento na transmissão do sinal nociceptivo, via ativação da fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC). A serotonina pode também aumentar a excitabilidade dos nociceptores por favorecer a ativação do receptor TRPV1, levando a um realce na percepção de estímulos térmicos nociceptivos. Foi demonstrado ainda, que a depleção da serotonina endógena é



capaz de reduzir a dor visceral por interferir com o funcionamento do receptor TRPV1 (QIN et al., 2010).

Além destes mediadores que potencialmente podem ativar o nociceptor existem aqueles que contribuem para a nocicepção através da sensibilização destes neurônios. Entre eles estão as citocinas, quimiocinas, as aminas simpatomiméticas, os derivados dos ácido araquidônico e o óxido nítrico.

As citocinas são polipeptídeos liberados por diferentes tipos celulares em resposta a uma variedade de agentes tais como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas (VERRI et al., 2006; KUBY, 1997; DINARELLO, 2000). Além disso, tem sido demonstrado que o desequilíbrio entre a liberação de citocinas pró-inflamatórias versus citocinas anti-inflamatórias, pode favorecer a manutenção da hiperalgesia inflamatória (ÜÇEYLER et al., 2009).

As citocinas inflamatórias mais conhecidas e estudadas que participam no desenvolvimento de dor são a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-6 (VERRI et al., 2006). Essas citocinas modulam a expressão gênica de outros mediadores inflamatórios porque ativam a proteína de translocação nuclear  $\kappa$ B, que regula a expressão de genes pró-inflamatórios (TAK & FIRESTEIN, 2001).

A IL-1 $\beta$  pode ser produzida por diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos e células gliais. Foi demonstrado que ela atua em várias etapas da inflamação, como recrutamento de células de defesa, febre, liberação de proteínas de fase aguda e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO, 2000; VERRI et al., 2006). Ela é processada e liberada pelas células mediante ativação de uma enzima pertencente à família de cisteína proteases, a caspase-1, e exerce seus efeitos atuando em receptores que estão envolvidos com a imunidade inata (DINARELLO, 2011, BORASCHI & TAGLIABUE, 2013).

As citocinas inflamatórias exercem sua atividade nas células alvo por se ligarem em receptores específicos que pertencem à mesma família dos receptores *toll-like*, os quais estão envolvidos com os mecanismos de imunidade inata, porque reconhecem vários componentes presentes nos microorganismos (BORASCHI & TAGLIABUE, 2013). Esta família de receptores é formada por um domínio comum a todos os receptores na região intracelular (o domínio TIR) e um domínio de sinalização da molécula receptora. No caso do receptor da IL-1 $\beta$ , uma vez ligado ao receptor, a citocina desencadeia uma mudança conformacional que permite o recrutamento de uma proteína acessória (a IL-1R3), então os dois domínios TIR

intracelulares se aproximam e iniciam uma complexa via de sinalização que positivamente modula os genes relacionados com a inflamação, dentre eles e particularmente importante para a nocicepção está o aumento da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima bastante importante na formação das PGs (BORASCHI & TAGLIABUE, 2013).

O TNF- $\alpha$  é produzido em grandes quantidades e muito rapidamente pelos macrófagos em resposta a um estímulo inflamatório, como por exemplo, infecção bacteriana (VERRI et al., 2006). Ele pode exercer seus efeitos via ativação de dois subtipos de receptores: TNF-R1 ou o TNF-R2 (WU, 2004), sendo o TNF-R1 particularmente importante nas ações sensibilizantes do TNF- $\alpha$  durante a hiperalgesia inflamatória. O TNF-R2 regula mecanismos de apoptose celular (WARE, 2005). Ambos os receptores são encontrados em vários tipos celulares e são formados por mais de 20 tipos diferentes de proteínas transmembrana, estruturalmente relacionadas em seus domínios extracelulares e que estão envolvidadas com a ativação do receptor pelo TNF- $\alpha$ . Sob ativação, esses receptores recrutam complexas vias intracelulares, dependendo da estrutura e da formação de seu domínio intracelular (WU, 2004). Assim a ativação do receptor TNF-R<sub>1</sub> pode mobilizar a participação de diferentes fatores associados ao receptor do TNF- $\alpha$  (conhecidos como TRAFs, do inglês, *TNF receptor associated factors*), levando a ativação de fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B, anteriormente mencionado (WU, 2004). A partir de então, ocorre a transcrição de genes pró-inflamatórios que regulam a produção de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, metaloproteases e outras enzimas, entre elas a COX-2, que favorecem a produção de mediadores inflamatórios (ZELOVÁ & HOSEK, 2013).

A IL-6 é outra citocina pleiotrópica sintetizada por uma ampla variedade de células, incluindo os monócitos, fibroblastos, células endoteliais, além de alguns tipos celulares pertencentes ao sistema nervoso central, como as células gliais. A quantidade de IL-6 produzida é regulada por diferentes fatores, incluindo agentes pró-inflamatórios, bactérias, vírus, neurotransmissores e segundos mensageiros (VERRI et al., 2006, TRAPERO & CAULI, 2014). A IL-6 ativa um receptor na superfície celular que é composto por duas glicoproteínas gp 130, transdutoras de sinais. Essas proteínas formam um complexo com a JAK quinase induzindo a sua ativação, levando a translocação da família de proteínas quinases STAT até o núcleo, local onde ela induzirá a transcrição gênica, com a indução da síntese de

mediadores inflamatórios, como por exemplo, os prostanóides (TRAPERO & CAULI, 2014). O envolvimento da IL-6 com os sinais da hiperalgisia inflamatória, devem-se então aos seus efeitos sensibilizantes, que em ratos foram bloqueados com um inibidor da ciclooxigenase. Em ratos, a IL-6 parece ser um elo pelo qual o TNF- $\alpha$  induz a liberação da IL-1 $\beta$  e esta por sua vez, induz a liberação dos prostanóides, capazes de induzir ao aparecimento da hiperalgisia (VERRI et al., 2006). Porém, em camundongos, a IL-6 parece induzir à hiperalgisia de uma maneira independente do TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , podendo ela por si só, induzir a liberação de prostanóides (CUNHA et al., 2005). Então, pode-se afirmar que a inibição da liberação ou da síntese desta citocina, pode ter um importante papel para inibir o aparecimento da dor inflamatória.

Os eicosanóides, que incluem as prostaglandinas ou prostanóides, leucotrienos e as lipoxinas são hormônios teciduais de curta meia-vida (HARIZI et al., 2008, LONE & TASKÉN, 2013). Eles são moléculas lipídicas pertencentes à extensa família de ácidos graxos com 20 átomos de carbono, do tipo ômega 3 e ômega 6 (SMITH, 1989, FUNK, 2001, PETHÕ & REEH, 2012). A síntese e liberação dos eicosanóides pelas células ocorrem em resposta a uma variedade de estímulos não específicos, incluindo hormônios, citocinas, fatores de crescimento e stress, sendo que a sua produção é consideravelmente aumentada durante os estados inflamatórios (HARIZI et al., 2008). O principal ácido graxo precursor para a biossíntese dos eicosanóides é o ácido araquidônico, que é encontrado nos fosfolípidos da membrana (WADA et al., 2007). O ácido araquidônico, liberado dos fosfolípidos da membrana pela fosfolipase citosólica A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), é então convertido para eicosanóides bioativos através das enzimas ciclooxigenase (COX), lipooxigenase (LOX) e p-450 epoxigenase, liberando respectivamente as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas e ácido hidroxieicosatetraenóico (HETES) e epóxidos (HARIZI & GUALDE, 2005, HARIZI et al., 2008). Os eicosanóides exercem um complexo controle sobre uma ampla gama de processos fisiológicos, além de estarem envolvidos na inflamação, atuando então como antiagregante ou agregante plaquetário, promovendo inibição da secreção ácida no estômago, controle do fluxo sanguíneo renal, dentre outros (HARIZI et al., 2008, NARUMIYA, 2009).

No caso da biossíntese das prostaglandinas, o ácido araquidônico é convertido nos compostos intermediários PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> através das ações das

enzimas COX1 e COX2, também conhecidas como PGH sintases 1 e 2. Essas enzimas atuam primariamente como ciclooxigenases para gerar a PGG<sub>2</sub> e depois como peroxidases, reduzindo o grupo peróxido da PGG<sub>2</sub> para um grupo alcoólico na PGH<sub>2</sub> (SMITH et al., 2000, SMITH et al., 2011). PGH<sub>2</sub> é então convertida enzimaticamente nos prostanóides: Prostaglandina D<sub>2</sub>, Prostaglandina I<sub>2</sub>, Prostaglandina F<sub>2α</sub>, Troboxano A<sub>2</sub> ou em Prostaglandina E<sub>2</sub> (LONE & TASKÉN, 2013).

Há duas isoformas da COX: a COX1 e a COX2. A COX1 é ativa constitutivamente, contribuindo para gerar prostaglandinas que são necessárias para o funcionamento celular, enquanto que a COX2 é induzida potencialmente após lesão ou inflamação (WILLINGALE et al., 1997). Dentre os fatores responsáveis pela indução da COX2, incluem as citocinas anteriormente referidas, tais como a IL-1β e o TNF-α (VERRI et al., 2006, DINARELLO, 2000).

Ainda, foi encontrada uma isoforma destas enzimas, denominada inicialmente de COX3. Esta isoforma foi encontrada somente em cães e expressa uma sequência de íntrons retidos, a partir da transcrição da COX1 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002, BOTTING, 2003). Sua existência em outras espécies bem como sua real função são ainda matérias de extensivo debate.

As quantidades relativas de cada isoforma da COX que são expressas em diferentes tecidos podem então ser moduladas nas condições patológicas (WILLINGALE et al., 1997). Por exemplo, a síntese da COX2 está supra-regulada na sinóvia de pacientes portadores de artrite e similarmente a injeção do agente flogístico carragenina ou caolim na pata de ratos, resultou em aumento na sua expressão (SANO et al., 1992, MITCHELL et al., 1995, SEIBERT et al., 1994).

Dentre todos os prostanóides gerados pela ação das COX, a prostaglandina E<sub>2</sub> é um exemplo de mediador lipídico que é liberado pelos tecidos inflamados e exerce importante ação na sensibilização e na gênese da dor inflamatória (ST-JACQUES & MA, 2013). O efeito nociceptivo da prostaglandina E<sub>2</sub> está relacionado com sua habilidade em sensibilizar os nociceptores para estímulos térmicos, mecânicos e químicos (SCHAIBLE & SCHIMDT, 1988; KUMAZAWA et al., 1996).

Com relação aos receptores dos eicosanóides, há quatro subtipos com afinidade pela prostaglandina E<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>), dois subtipos para a prostaglandina D<sub>2</sub> (DP<sub>1</sub> e DP<sub>2</sub>) e um receptor específico para a prostaglandina F<sub>2α</sub>, prostaglandina I<sub>2</sub>

ou tromboxano  $A_2$ , que são respectivamente os receptores FP, IP e TP (HARIZI et al., 2008, NARUMYIA, 2009).

Os receptores EP são expressos em diferentes tecidos, incluindo nos neurônios sensitivos periféricos (SOUTHALL E VASKO, 2001). Os receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> da prostaglandina E<sub>2</sub> são acoplados à proteína G, e quando estimulados, promovem elevação nos níveis do AMPc e ativação da PKA (NARUMYA, 2009). O receptor EP<sub>1</sub> é acoplado à proteína Gq, resultando em níveis aumentados do cálcio intracelular, por promover ativação da via do IP<sub>3</sub>. No caso do receptor EP<sub>3</sub>, existem três principais isoformas deste receptor, o EP<sub>3</sub>  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e elas podem ativar diferentes variedades de proteína G (LONE & TASKÉN, 2013).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a prostaglandina E<sub>2</sub> pode aumentar o potencial de repouso da membrana neuronal (MOMIN & MCNAUGHTON, 2009). Esta alteração, torna o neurônio mais susceptível para deflagrar um potencial de ação. Isto ocorre porque a corrente de cátions que ocorre entre o potencial de repouso e o limiar de disparo e que é dirigida para o interior do neurônio, fica realçada. Assim, a taxa de despolarização que ocorre no intervalo entre os potenciais de ação é portanto, aumentada (MOMIN & MCNAUGHTON, 2009). Concluindo, as prostaglandinas e em especial a prostaglandina E<sub>2</sub> diminuem o limiar de disparos dos neurônios sensitivos e aumentam o número de potenciais de ação evocados por estímulos supraliminares, induzindo, portanto um estado de hipersensibilidade, no qual estímulos dolorosos tornam-se ainda mais dolorosos. (MEVES, 2006).

As quimiocinas compreendem outra classe de peptídeos inflamatórios que tem a função de recrutar neutrófilos e linfócitos para o local inflamado, além de estarem envolvidas com os mecanismos de angiogênese, crescimento celular, modulação da resposta imune, febre e indução da hiperalgesia inflamatória (BAGGIOLINI, 2001, VERRI et al., 2006). Como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretoras produzidas pelos leucócitos ou por células teciduais, cuja liberação aumenta significativamente após lesão. Após a síntese, elas são clivadas dentro da própria célula que as gerou e depois liberadas como pequenos peptídeos, formados em geral por uma sequência de 20-25 aminoácidos, exercendo seus efeitos localmente, através de receptores acoplados a proteína G, expressos nas células (BAGGIOLINI, 2001, VERRI et al., 2006). As vias intracelulares envolvidas com o mecanismo de transdução do receptor de quimiocinas resultam da ativação

da proteína G heterotrimérica associada ao receptor, levando à ativação da PLC. A PLC, por sua vez, gera segundos mensageiros como o  $IP_3$  e o DAG que levam ao aumento do conteúdo intracelular de cálcio e ativação de várias isoformas da proteína quinase C, respectivamente (THELEN et al., 1988). Além disso, outras proteínas quinases, como as da família MAP quinases também podem estar envolvidas com a via de sinalização celular mediada pela ativação dos receptores de quimiocinas (BAGGIOLINI, 2001).

Dentre as quimiocinas que exercem papel na indução da dor, destaca-se a interleucina-8 (IL-8) ou quimiocina  $CXCL_8$  (CUNHA et al., 1991, VERRI et al., 2006). Quando injetada diretamente na pata de roedores, a quimiocina  $CXCL_8$  produziu hiperalgesia mecânica de maneira dose-dependente. Embora, as espécies de roedores não sejam produtoras de IL-8, elas produzem outras quimiocinas que são quimicamente relacionadas a ela e que tem afinidade pelo mesmo tipo de receptor, o  $CXCR_2$ , tais como as quimiocinas Derivado de Queratinócitos (KC) e Químioatraente para Neutrófilos induzido por Citocinas 1 (CINC-1) de camundongos e ratos, respectivamente (CUNHA et al., 1991, VERRI et al., 2006). A hiperalgesia induzida pela IL-8 ou pelos seus análogos em roedores, foi completamente inibida mediante o tratamento dos animais com drogas bloqueadoras dos neurônios simpáticos, como a guanetedina, bem como pelo uso de antagonistas dos receptores adrenérgicos ou dopaminérgicos, levando a conclusão que essas quimiocinas são responsáveis por recrutar a participação do componente simpático na hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 1991, CUNHA et al., 2005). Como resultado disso, pode-se concluir que a inibição da liberação ou o bloqueio da ação dessas quimiocinas, tem importante efeito para diminuir a hiperalgesia inflamatória, porque bloqueia parcialmente uma das vias responsáveis pela indução da hiperalgesia inflamatória, no caso, o componente simpático (CUNHA et al., 1991, VERRI et al., 2006).

O envolvimento do sistema nervoso simpático com os estados de hiperalgesia foi demonstrado tanto em modelos clínicos como em modelos experimentais (JÄNIG et al., 1996, RAJA et al., 1998). Esse efeito tem sido atribuído pela ativação das fibras simpáticas pós-ganglionares durante os estados de inflamação (KHASAR et al., 1999). Porém, concomitante a isso, pode ocorrer ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com liberação aumentada da noradrenalina, que ligando-se nos receptores  $\beta$  adrenérgicos das fibras nociceptivas, pode realçar a condutância iônica pelos canais de  $Na^+$  TTX-R, mediante ativação da via AC/AMPC/PKA

(KHASAR et al., 1999). Além dessa via, outras vias de transdução intracelulares foram também relacionadas com o efeito hiperalgésico das aminas simpáticas, como ativação da PKC, da MAP quinase e da ERK quinase, que também contribuem para os estados de sensibilização aguda e crônica da dor inflamatória (VILLAREAL et al., 2009).

O NO é um exemplo de outro mediador que pode induzir a sensibilização dos nociceptores. Ele é um mensageiro intra e intercelular, gerado pela oxidação do nitrogênio terminal da L-arginina, que é então convertida para citrulina via óxido nítrico sintetase (NOS) (ROMERO et al., 2011, GUZIK et al., 2003).

O NO assim como outros mediadores da dor inflamatória, está envolvido também com o desenvolvimento da sensibilização central (CURY et al., 2011).

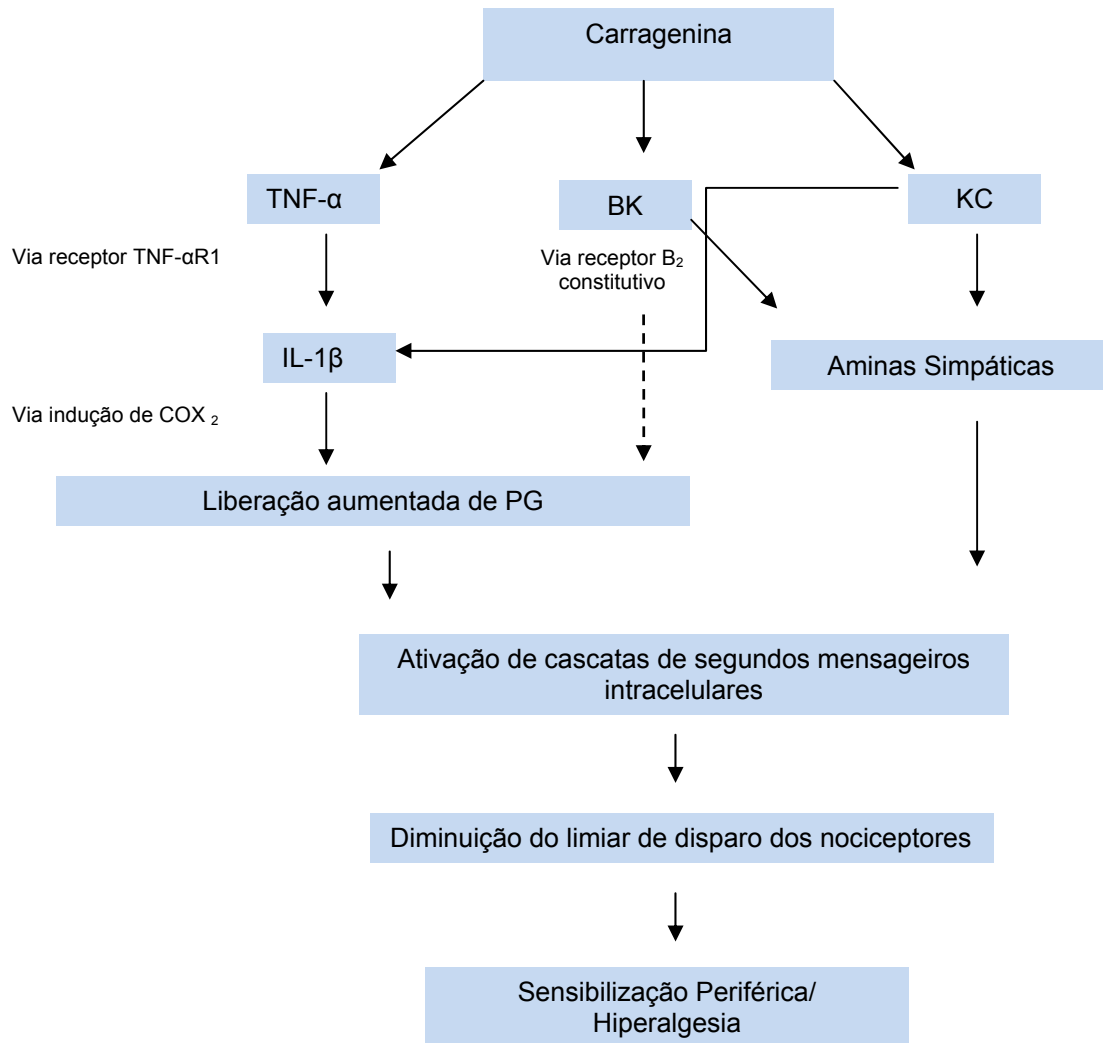
Na sensibilização central ocorrem alterações no padrão de expressão de receptores e canais iônicos nas sinapses do corno dorsal da medula, além do bloqueio das sinapses inibitórias para a nocicepção (SCHMIDTK et al., 2009). Em consequência disso, ocorre aumento na excitabilidade das aferências nociceptivas, contribuindo para os estados de dor clinicamente relevantes (SCHAIBLE & RICHTER, 2004, MILLAN, 1999).

Existem três isoformas de NOS: a neuronal (NOS1), a induzível (NOS2) e a endotelial (NOS3) (LEÁNEZ et al., 2009). A presença de um processo inflamatório induz ao aumento na expressão da NOS1 e da NOS2 tanto na medula espinhal quanto nos tecidos periféricos, liberando portanto, o NO (CHU et al., 2005; DE ALBA et al., 2006). A atividade das NOS constitutivas (NOS1 e NOS3) é dependente da concentração do  $Ca^{2+}$  intracelular. Já a NOS2 independe dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  para gerar os seus efeitos (SCHMIDTKO et al., 2009). Uma vez gerado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, que é diretamente responsável pelo aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (MONCADA et al., 1991). Então a sensibilização dos terminais nociceptivos envolve a ativação de diferentes proteínas quinases dependentes do GMPc, que atuam fosforilando canais iônicos, contribuindo para gerar potenciais de ação (MILLAN, 1999, CURY et al., 2011, GUZIK et al., 2003). Nos neurônios do corno dorsal, a liberação do NO pela NOS1 contribui para o processo de sensibilização central, pois é influenciada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  resultante da ativação dos receptores NMDA e promove supressão das sinapses inibitórias reguladas pelos interneurônios gabaérgicos e glicinérgicos (SCHMIDTKO et al., 2009). No entanto

existem dados que sugerem que ambas as NOS (induzível e neuronal), contribuem para a liberação periférica do NO durante a inflamação (TORIYABE et al., 2004, OMOTE et al., 2001). Por outro lado, vários estudos prévios demonstraram que a liberação central e periférica do NO, pode também promover antinocicepção. Periféricamente, esse efeito foi observado pela atenuação da hiperalgesia inflamatória mediante administração prévia de agentes indutores da NOS, de agentes doadores de NO e de agentes inibidores da fosfodiesterase, enzima responsável pela degradação do GMPc (DE ALBA et al., 2006, DUARTE et al., 1990, DUARTE et al., 1992). Contrariamente houve exacerbação do comportamento nociceptivo induzido pela Prostaglandina E<sub>2</sub>, mediante o pré-tratamento local com inibidores da guanilato ciclase e de inibidores da NOS (DUARTE et al., 1992). Esse efeito antinociceptivo periférico do NO envolve a participação de canais de K<sup>+</sup> e está envolvido com um mecanismo adicional de várias drogas analgésicas popularmente conhecidas, tais como a dipirona, o cetocolaco, o diclofenaco e o rofecoxib (LÁZARO-IBÁÑEZ et al. 2001, ALVES & DUARTE, 2002, ORTIZ et al., 2003, DÉCIGA-CAMPOS & LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2004).

A cascata de mediadores liberados após a injeção de carragenina em camundongos, por ser mais relevante para este estudo, está representada na figura 1. Este modelo de indução de hiperalgesia pode fornecer um excelente instrumento para o estudo do mecanismo de ação de novas drogas, pois através de uma avaliação do efeito seletivo destas drogas sobre os diferentes componentes propostos, podemos ter uma idéia de como este composto está atuando. Portanto, em uma parte do presente estudo, utilizaremos este modelo.





**Figura. 1** Sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina em camundongos, intermediada por citocinas e indução final de prostanóides (PG) e Aminoácidos Simpáticos. A Bradicidina (BK) promove sensibilização por efeito direto no receptor B<sub>2</sub> independentemente da liberação de citocinas (modificado de Cunha et al., 2005, Cunha et al., 2007).

#### 1.4 A Participação dos Receptores TRP na Hiperálgia Inflamatória

Paralelamente ao modelo citado anteriormente, ainda torna-se necessário abordar um pouco sobre canais iônicos, que podem ser ativados durante a nocicepção. Como anteriormente descrito, a inflamação e a disfunção de nervos periféricos estão associados com aumento da excitabilidade dos nociceptores como um resultado de mudanças nas suas propriedades de condutância iônica, levando a suposição de que os terminais nociceptivos detectam estímulos mecânicos, térmicos e químicos através de canais iônicos. De fato, os estudos confirmaram que tanto o calor, como a capsaicina – a substância pungente presente na pimenta vermelha – induzem o influxo de cálcio nos nociceptores (OH et al., 1996, CESARE & MCNAUGHTON, 1996). Neste caso, o estímulo nociceptivo induzido pelo calor é dependente de um receptor que foi funcionalmente descoberto através de técnicas de clonagem gênica, esse receptor é denominado de receptor de potencial transitório vanilóide (TRPV1) (CATERINA et al., 1997).

Os receptores TRP representam uma das maiores famílias de canais iônicos que estão presentes em toda a árvore filogenética partindo dos fungos aos humanos (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2007). Nos mamíferos essa família de canais foi subdividida em seis subfamílias: TRPC (Canônico), TRPV (Vanilóide), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA1 (Anquirina). Eles possuem seis domínios transmembrana ladeados por regiões carboxi e aminoterminais intracelulares de comprimento variável, formando um poro entre o quinto e o sexto domínio transmembrana (BAUTISTA et al., 2012.). Nos mamíferos a homologia entre as sequências dos receptores TRP é baixa e eles exibem diferentes maneiras de serem ativados, como por temperatura, compostos químicos, osmolaridade, estimulação mecânica, lipídios, luz, estresse oxidativo, ácidos e ferormônios (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2007). Atualmente, esses receptores são tidos como transdutores de sinais que podem participar do mecanismo de nocicepção que é evocado por diferentes modos, sejam eles estímulos químicos, mecânicos ou térmicos. Entretanto, esses receptores são ditos de polimodais, pois muitos respondem para mais de um tipo de estímulo, podendo ser sensibilizados por diferentes mediadores inflamatórios. Esses dados estão agrupados na tabela a seguir, mostrando os principais receptores TRP envolvidos no processo de sensibilização que ocorre na dor inflamatória.

Canal	Mediadores envolvidos na sensibilização e vias ativadas	Referências
TRPV1: ativado por temperatura > 43° C, modulado por baixo pH(<5.9), compostos vanilóides, cânfora, alicina, NO, veneno de aranha	BK, ATP, NGF, Serotonina, Histamina, proteases e quimiocinas, via ativação da PLC. Pode ser fosforilado pela PKA, PKCε, proteína quinase dependente de Ca <sup>2+</sup> Calmodulina (CAMKII) ou pela Src quinase. NGF atuando em seu receptor TrKA, via PI3K, induz a inserção de canais TRPV <sub>1</sub> na membrana celular. BK atua via B2-PLC-PKCε-AKAP-TRPV <sub>1</sub> Produtos da via da LOX, como 12 e 15-HPETES e 5 e 15 HETES. PG via ativação de receptores EP/IP, promove liberação de AMPc com ativação da PKA responsável por fosforilar resíduos de serina do canal TRPV1	Mandadi et al., 2006, Piper et al., 1999; Shin et al., 2002; Ji et al., 2002; Premkumar & Ahern, 2000; Zhang et al., 2008; Pethő & Reeh, 2012, Stucky et al., 2009.
TRPA1: ativado por T<17°C, por estimulação mecânica e agentes irritantes, tais como alil isotiocianato, alicina, cinamaldeído e formalina.	BK via ativação da PLC Durante o processo inflamatório, ocorre a liberação de compostos oxidantes, como por exemplo, o 4-hidroxi-nonenal ou o peróxido de hidrogênio que ativam diretamente o TRPA1. PG e Aminas simpáticas via PKA e PLC.	Mcpherson et al., 2007; Taylor-Clark et al., 2008; Bautista et al. 2013; Wang et al., 2008; Petho & Reeh, 2012; Stucky et al., 2009.
TRPM8: ativado por temperaturas entre 23 a 8°C, mentol, icilina, Eucaliptol	Regulado negativamente pela BK, por um mecanismo que envolve a degradação do PIP <sub>2</sub> que é necessário para o funcionamento normal do canal. Sofre modulação pelo pH intracelular, sendo que esse fator regula a temperatura em que o canal é aberto.	Petho & Reeh, 2012; Andersson et al., 2004; Levine & Alessandri-Haber, 2007.
TRPV4: ativado por osmolaridade diminuída, calor inócuo, estér de forbol, baixo pH, citrato, endocanabinóides e metabólitos do ácido araquidônico	Promove hiperalgesia mecânica através dos segundos mensageiros PKA e PKCε, via ativação de receptores acoplados a proteína G. Pode ser sensibilizado também por Prostaglandina E <sub>2</sub> e serotonina. TRPV4 não contribui para o limiar mecânico basal, mas está envolvido com a hiperalgesia mecânica nos estados inflamatórios e também na dor neuropática, provavelmente via interação com a proteína α <sub>2</sub> integrina que via Src quinase iniciam uma cascata de sinais que culminam com a inserção de canais TRPV <sub>4</sub> na membrana.	Levine & Alessandri-Haber, 2007; Grant et al., 2006; Alessandri-Haber et al., 2008.

**Tabela 1.** Principais canais TRP envolvidos na sensibilização da dor inflamatória. BK: Bradicina, ATP: Adenosina Trifosfato, NGF: Fator de Crescimento Derivado do Nervo, PKC: Proteína Quinase C, PKA: Proteína Quinase A, TrKA: Receptor Acoplado a Tirosina Quinase, PI<sub>3</sub>K: Fosfoinositídeo 3-quinase, PLC: Fosfolipase C, AKAP: Proteína Quinase de Ancoragem, LOX: Lipooxigenase, 12 e 15-HPETES: Ácidos 12 e 15 (S) hidroperoxi-eicositetraenóico, 15-HETES: Ácido 15- (S)-Hidroieicositetraenóico, PG: Prostaglandina, AMPc: Adenosina Monofosfato Cíclico, PIP<sub>2</sub>: 4,5 Bifosfato de Fosfatidilinositol.

Além dos receptores TRP outros canais também estão envolvidos com a percepção da dor inflamatória, como é o caso dos Canais Iônicos Sensíveis a Ácidos (ASIC), que pertencem à superfamília de Canais de Na<sup>+</sup> Epiteliais Degenerina (DEG/ENaC). Estes canais são ativados por prótons extracelulares e são sensíveis ao diurético amilorida (YUAN et al., 2010). Evidências apontam que os canais ASIC contribuem para a patogênese da dor inflamatória crônica bem como para reações isquêmicas, devido a sua propriedade de resposta frente a acidose tecidual (WANG et al., 2006). Existem sete subtipos diferentes de canais ASIC, mas há uma forte correlação entre o ASIC3 e os escores de dor, pois a esse subtipo é atribuído um influxo iônico sustentado em resposta à acidose extracelular (SUTHERLAND et al., 2001, YUAN et al., 2010).

### **1.5 O Tratamento da Dor Inflamatória**

Apesar dos avanços nos mecanismos moleculares subjacentes ao processo de sensibilização que ocorre na hiperalgesia inflamatória, houve pouca evolução no tratamento clínico para esse tipo de dor, sendo que na maioria dos casos recorre-se ao uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e/ou aos opiáceos.

A maioria dos AINEs é composta de ácidos orgânicos e atua como inibidor competitivo reversível da COX, inibindo então a produção das prostaglandinas, que são liberadas durante o processo inflamatório e sensibilizam diretamente os nociceptores, como explicado anteriormente (VANE & BOTTING, 1996). Os AINEs são os analgésicos mais utilizados na prática clínica, porém apresentam vários efeitos colaterais indesejáveis como ulceração e intolerância gástrica, inibição da função plaquetária, prolongamento da gestação, alterações da função renal além de reações de hipersensibilidade (VANE & BOTTING, 1996; NIELSEN et al, 2006). Esses efeitos são atribuídos em parte por interferirem com as concentrações fisiológicas das prostaglandinas que são necessárias para a homeostasia gástrica e renal. Os inibidores seletivos da COX<sub>2</sub> (como celecoxibe) apresentam menor incidência de lesão ao trato gastrointestinal, porém alguns deles apresentaram risco aumentado para infarto agudo do miocárdio e morte súbita (NIELSEN et al., 2006, GRAHAM et al., 2005). Esses eventos associados com a inibição seletiva da COX<sub>2</sub> são atribuídos ao comprometimento no balanço entre os eicosanóides pró-trombóticos e antitrombóticos, favorecendo, portanto a formação de trombos

induzida por agregação plaquetária (GRAHAM et al., 2005, MUKHERJEE et al., 2001). Porém, alguns estudos forneceram evidências suficientes de que parte dos efeitos colaterais e das ações anti-inflamatórias e analgésicas dos AINEs incluem sua interação com outros sistemas, como com os endocanabinóides, óxido nítrico, sistemas monoaminérgico e colinérgico, além da inibição da COX (GÜHRING et al., 2002, VANDIVIER et al., 1999, SANDRINI et al., 2002, PINARDI et al., 2002, HAMZA & DIONNE, 2009).

O paracetamol e a dipirona são amplamente utilizados no combate a dor, entretanto eles representam um grupo à parte de analgésicos, pois como eles são fracos inibidores das COX1 e COX2, eles não apresentam os efeitos anti-inflamatórios característicos dos AINEs, apesar de serem igualmente efetivos para o alívio da dor inflamatória e também da febre (REZENDE et al., 2008). O mecanismo molecular e a ação analgésica de ambos têm sido discutidos há muito tempo. Estudos anteriores tem relacionado seu efeito com a inibição central da COX<sub>3</sub>, porém esses fármacos demonstraram efeitos analgésicos quando aplicados localmente, sendo que esses efeitos foram funcionalmente diferentes (REZENDE et al., 2008).

Como referido anteriormente, a ativação da via da L-Arg/NO/GMPc está envolvida com a ativação de vias antinociceptivas capazes de promover a dessensibilização dos nociceptores durante a hiperalgesia inflamatória, bem como com a ação antinociceptiva de compostos popularmente utilizados como analgésicos, dentre estes, a dipirona. Os estudos experimentais feitos com a dipirona demonstraram que a inibição das enzimas envolvidas com a síntese de NO e do GMPc, a NOS e a guanilato ciclase, respectivamente, interferem diretamente na ação antinociceptiva desse composto (DUARTE et al., 1992). Posteriormente, foi demonstrado que a aplicação local da dipirona diretamente na pata de ratos reverteu de maneira dose-dependente a hiperalgesia mecânica induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub> eliminando a possibilidade de que seu efeito antinociceptivo periférico seja resultante da inibição da COX (ALVES & DUARTE, 2002). Adicionalmente, estes autores encontraram que esse efeito antinociceptivo periférico da dipirona, foi revertido de maneira dose-dependente pelo tratamento dos animais com a glibenclamida ou com a tolbutamida, duas sulfoniluréias conhecidas pelos seus efeitos bloqueadores em canais de potássio sensíveis ao ATP, indicando o envolvimento desses canais no efeito antinociceptivo periférico da dipirona (ALVES

& DUARTE, 2002). Os resultados obtidos com esses estudos indicam que a dipirona é capaz de prevenir a sensibilização dos nociceptores na hiperalgesia inflamatória, por promover a ativação da via da L-Arg/NO/GMPc/Canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP (ALVES & DUARTE, 2002). Em paralelo com esses resultados, foi encontrado o envolvimento dessa mesma via na ação antinociceptiva de outras substâncias analgésicas, como diclofenaco, morfina e cetocolaco (ALVES et al., 2004, CUNHA et al., 2010, LÁZARO-IBÁÑEZ et al., 2001). Então, esses compostos parecem atuar diretamente como analgésicos periféricos capazes de restaurar o limiar dos nociceptores por promoverem a abertura dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP (SACHS et al., 2004). Esse efeito é modulado ou diretamente pelo cGMP gerado pela liberação de NO no próprio neurônio nociceptivo, ou indiretamente via estimulação da proteína quinase G (SACHS et al., 2004).

Outras hipóteses relacionadas à mecanismos de ação adicionais tanto do paracetamol quanto da dipirona, apontam para seu envolvimento com o sistema serotoninérgico, endocanabinóide, com os opióides endógenos e com a via glutamatérgica dependendo do modelo e da via utilizada (ALLOUI et al., 2002, VANEGAS & TORTORICI, 2002, DUARTE et al., 1992, SIEBEL et al., 2004, ROSGOCH et al., 2012).

Os opióides tais como morfina e codeína, representam outro grupo de drogas utilizadas para o alívio da dor inflamatória, embora seu uso para o tratamento da dor crônica não maligna seja controverso, devido aos seus efeitos colaterais, como adição e abuso (ROSENBLUM et al., 2008). Seu efeito analgésico deriva principalmente da interação com os receptores opióides  $\mu$  que estão amplamente distribuídos, sendo encontrados tanto nas sinapses do corno nervoso dorsal e em suas projeções como na periferia. Assim, os opióides mimetizam as ações dos opióides endógenos, que são naturalmente liberados em resposta para situações estressantes, como um estímulo nocivo persistente (FIELDS, 2007). Ao nível intracelular esses efeitos são o resultado do acoplamento de seus receptores com a proteína G inibitória, promovendo inibição na geração do AMPc, além de inibir canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes e estimular o efluxo de  $K^+$ , promovendo hiperpolarização da membrana neuronal (FIELDS, 2007). No entanto, além da propensão para causarem dependência e abuso quando usados por período prolongado, este grupo de fármacos promove também outros efeitos colaterais. Estes efeitos estão relacionados com a ativação de receptores envolvidos com

diferentes funções tanto periféricas como centrais. Dentre esses efeitos podemos citar a redução da peristalse (levando a constipação intestinal), coceira, miose, sonolência, confusão mental e depressão respiratória (JAFFE & JAFFE, 2004). Além disso, outros efeitos podem acarretar em diminuição na responsividade, com o aparecimento de tolerância, com diminuição progressiva de seus efeitos analgésicos, além da hiperalgesia paradoxal que é um fenômeno clinicamente relevante (BENYAMIN et al., 2008, FERRINI et al., 2013).

Deste modo, embora existam diversas abordagens para o tratamento da dor, a busca de novos compostos e novas estratégias terapêuticas se justifica tendo em vista a ocorrência de efeitos colaterais importantes, bem como a inefetividade de algumas drogas sobre tipos específicos de dor.

### **1.6 A Importância dos Fitoterápicos e a *Sinningia* *Aggregata***

Os compostos de origem natural representam a base para os cuidados com a saúde desde o início da civilização. No Brasil, a utilização das plantas medicinais faz parte da cultura popular, sendo originária no tempo da colonização, em que o tratamento das doenças era feito basicamente com ervas conhecidas pelos indígenas. Por muito tempo tal procedimento, representou a principal forma de cura, especialmente na população rural em que o conhecimento empírico a respeito das plantas com propriedades medicinais era transmitido ao longo das gerações. Essa tradição e a enorme biodiversidade nacional fazem do Brasil um país com alto potencial para se destacar na produção de fitoterápicos, ou seja, de medicamentos industrializados obtidos a partir de plantas (CALIXTO, 2003). Além disso, através de estudos com tecnologias apropriadas e considerando o envolvimento entre a farmacologia e a química, é possível isolar o princípio ativo que é o responsável pelo efeito terapêutico das plantas, e então a partir dele desenvolver outros novos compostos, visando uma nova possibilidade de tratamento terapêutico, sem os efeitos tóxicos que o composto inicial poderia produzir (SIMÕES, 2007).

Fica claro então que as opções de tratamento terapêutico seriam muito mais difíceis se não fossem a descoberta dessas substâncias ativas derivadas de plantas medicinais, especialmente para a inibição da dor de origem inflamatória que é hoje essencialmente tratada com os AINEs (SIMÕES, 2007). O aparecimento de complicações associadas ao uso indiscriminado desses anti-inflamatórios, pode

comprometer a qualidade de vida. Estima-se que o número de pacientes que desenvolvem úlcera em razão dos AINEs se situe entre 10 e 30%. Além disso, essa classe de fármacos é atualmente a mais procurada como forma de venda livre nas farmácias (ZATERKA et al., 2000). Aliado a isso, no ramo do processamento da dor, novas vias que induzem a sensibilização dos nociceptores estão sendo desvendadas, como possível alvo para desenvolvimento de novos fármacos, em detrimento as drogas comumente utilizadas (AINEs e opióides), que como explicadas anteriormente, produzem muitos efeitos colaterais.

A família *Gesneriaceae* é formada por 150 gêneros e 3000 espécies, nativas de regiões mais quentes, principalmente nos trópicos, e portanto, pouco encontradas em áreas temperadas (VERDAN & STEFANELLO, 2012). Essa família de plantas formam pequenos arbustos cujas folhas, na maioria das vezes, apresentam pêlos e belas flores, atribuindo o sentido ornamental a elas. Há estudos relatando o uso popular de espécies pertencentes a esta família de plantas contra febre, problemas respiratórios, inflamação, em feridas (provavelmente como cicatrizantes), picadas de cobras e em doenças infecciosas (VERDAN & STEFANELLO, 2012). No entanto, a composição química minuciosa e a possível aplicação terapêutica dessa família de plantas foi muito pouco analisada.

Os estudos demonstram que foram isolados somente cerca de 300 compostos em toda a família das *Gesneriaceae*, incluindo flavonóides, terpenos e esteróides, compostos fenólicos, quinonas, lignanos, xantonas e compostos com esqueleto químico incomum, formado por um anel heterocíclico de sete membros, que receberam a denominação de agregatinas (VERDAN & STEFANELLO, 2012). Desses estudos foi observada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral para as espécies *Didymocarpus pedicellata*, *Corallodiscus lanuginosus*, *Didymocarpus crinita*, *D. primulifolius*, *Kohleria deppeana* e *Rytidophyllum tomentosum* e ação anti-inflamatória similar à indometacina para a fração acetato de etila do extrato etanólico de *Kohleria deppeana* (NOGUERA et al., 1994, VERDAN & STEFANELLO, 2012).

O gênero *Sinningia* é o principal gênero da família das gesneriáceas no Brasil, sendo formado por 68 espécies, e destas a maioria é encontrada nas regiões centro-oeste, sudeste e sul (VERDAN et al., 2010). Há poucos relatos do uso dessa família de plantas na medicina popular, porém foi encontrado que a *S. allagophylla* é utilizada como tônico, emoliente e febrífugo (GOMES & SHEPHERD, 2000). Além disso, os estudos desenvolvidos com o extrato etanólico da *S. allagophylla*



demonstraram que a espécie tem atividade antiproliferativa contra várias linhagens de tumor que se desenvolvem em humanos (RIVA et al., 2012). Também foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo, que o extrato etanólico da *S. allagophylla* possui ação antinociceptiva, sendo um efeito parcialmente atribuído à presença do 8-metoxilapachenol (BARBOSA et al., 2013). Além disso, antraquinonas foram encontradas nas espécies *S. allagophylla* e *S. speciosa* e há diversos estudos que associam essa classe de compostos com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória observadas em outras espécies de plantas (LUO et al., 2010, LU et al., 2011).

Nesse sentido, a composição química da espécie *Sinningia aggregata* foi investigada e foram encontrados óleos essenciais, antraquinonas e componentes aromáticos anteriormente mencionados, cujas estruturas químicas foram denominadas agregatinas A-D (STEFANELLO et al., 2005; VERDAN et al., 2010). A Agregatina D é uma naftoquinona, inédita e descrita pelo nosso grupo com um esqueleto químico diferente do usual. Esta naftoquinona foi isolada na fração acetato de etila do extrato etanólico da *S. aggregata*. Em estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo demonstramos que o extrato bruto da *S. aggregata*, bem como a Agregatina D, quando administrado por via oral foram efetivos na redução da fase inflamatória da nocicepção induzida pela formalina e na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina na pata posterior traseira, com inibição de  $69\pm 10\%$  e de  $57\pm 8\%$ , respectivamente (Ver Anexo). As doses do extrato bruto e da Agregatina D por via oral foram de 30 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente e não afetaram o desempenho motor dos animais, sugerindo que o efeito observado não estava relacionado a uma alteração na capacidade dos animais em executar o comportamento nociceptivo. Ainda, demonstramos que tanto o extrato bruto quanto a Agregatina D não foram efetivas em reduzir a nocicepção térmica. Por esses motivos, esse composto parece possuir uma excelente atividade antinociceptiva e conhecer melhor seu modo de ação nos pareceu interessante.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade da Agregatina D sobre a hiperalgesia mecânica induzida por diferentes mediadores e segundos mensageiros inflamatórios, sobre a liberação de NO por macrófagos peritoneais e sobre a nocicepção induzida por ativadores de canais iônicos, com o intuito de buscar evidências que possam auxiliar no esclarecimento de seu mecanismo de ação antinociceptiva.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Determinar a dose efetiva de Agregatina D, por via intraplantar, sobre a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.

Avaliar o efeito da administração intraplantar de Agregatina D sobre a hiperalgesia mecânica induzida pelos mediadores inflamatórios Bradicnina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1, Prostaglandina E<sub>2</sub> e Dopamina.

Avaliar o efeito da administração intraplantar Agregatina D sobre hiperalgesia mecânica induzida pela ativação da adenilato ciclase e por AMPc.

Avaliar se o efeito analgésico periférico observado após a administração intraplantar de Agregatina D sobre a hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandinas, depende da abertura de canais de potássio dependentes de ATP.

Avaliar o efeito da Agregatina D sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos.

Avaliar o efeito da Agregatina D sobre a nocicepção induzida por ativadores dos receptores TRP.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos machos da variedade *Swiss*, pesando entre 25-35 g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro 12 h), com livre acesso à ração e água antes dos experimentos. Os animais foram aclimatados na sala de experimento no mínimo 2 h antes dos testes e foram utilizados uma única vez em cada experimento. Todos os procedimentos foram submetidos para aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR) sob nº 628 e 722. As diretrizes vigentes para o cuidado com animais de laboratório do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal e orientações éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983) foram adotadas. Todos os experimentos foram realizados entre às 08h até as 17h.

#### **3.2 Material Botânico**

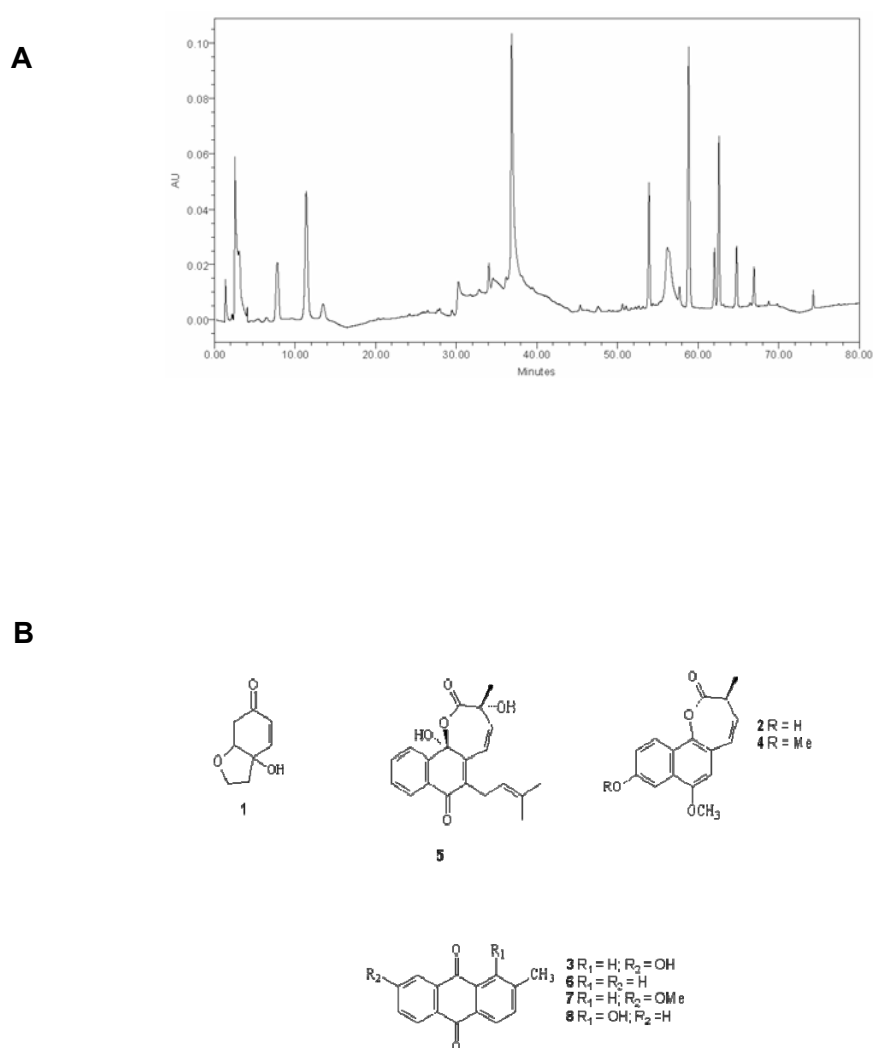
Os bulbos de *Sinningia aggregata* (Ker-Gawl) foram coletados em Tibagi -PR, em maio de 2007 e foram identificados por Clarice Poliquesi. Um *voucher* da espécie (# 290738) foi depositado no herbário do Museu Botânico Municipal (MBM) em Curitiba -PR. A responsável pela obtenção do extrato etanólico e também pelo isolamento e identificação da Agregatina D foi a professora Dr<sup>a</sup>. Maria Élide A. Stefanello do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

#### **3.3 Extração e Isolamento da Agregatina D**

Todos estes procedimentos foram realizados pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Élide Alves Stefanello e pela doutoranda Maria Helena Verdan. Suscintamente, os bulbos dessecados e pulverizados (50,5 g) foram extraídos em temperatura ambiente com etanol (3X de 200 mL), o solvente foi removido sobre baixa pressão e rendeu o extrato bruto em etanol (EESAg 4,2g). Este foi então ressuspenso em solução 1:1 de etanol em água e submetido à partição com éter de petróleo, diclorometano, acetato

de etila e 1-butanol e depois da remoção do solvente, essas frações renderam 4.1%, 5.0%, 23.3% e 35.1%, respectivamente. Os ensaios biológicos mostraram que a atividade antinociceptiva estava presente na fração acetato de etila (EtOAc). Agregatina D (3%) foi identificada e purificada desta fração.

Um cromatograma analítico ilustrativo do EESA<sub>g</sub> é mostrado na figura 2. Este cromatograma foi registrado em um equipamento de Cromatografia HPLC Waters composto por bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower. As análises foram conduzidas utilizando uma coluna analítica Nucleosil 100-5 C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, marca Macherey-Nagel (Alemanha). Para as fases móveis foram utilizados solventes orgânicos grau HPLC, filtrados em membrana de nylon (0,45 µm) da Millipore® (SP, Brasil) e desgaseificados por 30 min em um banho de ultrassom. Foi utilizada água ultrapura obtida através de sistema Milli-Q. As amostras foram filtradas em filtro Millex®HV PVDF (0,45 µm) da Millipore® (Cork, Ireland). O eluente utilizado consistiu de uma mistura de água (A) e metanol (B), em um gradiente linear, que variou de 10-100% de B em 60 min, mantendo constante 100% B até 80 min. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção foi de 10 µL e a concentração das amostras de 1 mg/mL. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 254 nm. Extratos e substâncias puras, previamente isoladas da planta foram analisadas nas mesmas condições (VERDAN et al., 2010; VERDAN, 2012). A identificação dos picos nos cromatogramas foi feita por comparação dos tempos de retenção das substâncias puras utilizadas como padrões.



**Figura 2.** Cromatograma representativo do extrato etanólico de *S. aggregata*. A estruturas dos compostos evidenciados no painel A são mostradas no painel B da figura: Haleridona (1), Agregatina A (2), 7-Hidroxitectoquinona (3), Agregatina C (4), Agregatina D (5), Tectoquinona (6), 7-Metoxitectoquinona (7), Tectoquinona (8) (VERDAN et al., 2010; VERDAN, 2012).

### 3.4 Drogas

Carragenina, dipirona, Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), bradicinina, cloridrato de dopamina, forskolina (ativador da enzima adelinato ciclase), dibutilil adenosina monofosfato cíclico (DbAMPc, análogo permeável do AMPc), glibenclamida (bloqueador seletivo dos canais de potássio sensíveis ao ATP), vermelho de rutênio (antagonista não seletivo dos canais TRP), amilorida (bloqueador de canal epitelial de Na<sup>+</sup>), cinamaldeído (ativador de canal TRPA1), mentol (agonista de canal TRPM8), dexametasona, capsaicina (Cap, ativador de canal TRPV1), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) e LPS (*Escherichia. coli* 0111:B4) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO - E.U.A).

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e CINC-1 foram adquiridos da R & D Systems, Minneapolis, E.U.A.

As drogas foram diluídas em solução fisiológica estéril, com exceção da glibenclamida, da forskolina, da capsaicina e do mentol. A glibenclamida foi diluída em tween 80 1%, em solução fisiológica. A forskolina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) 5% em solução fisiológica. O mentol foi diluído em 1,6% de etanol e 0,01% de tween 80 em solução fisiológica. A capsaicina foi diluída em solução 10% de etanol, 10% de tween 80 em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, 10 mg/mL). As doses dos estímulos nociceptivos, dipirona e glibenclamida foram baseadas em estudos anteriores (CUNHA et al., 2005, CUNHA et al., 2007, ALVES & DUARTE, 2002, CUNHA et al., 2004, BAGGIO et al., 2012, ANDRADE et al., 2008, OTUKI et al., 2005, DINA et al., 2005).

#### 3.4.1 Soluções e tampões

Os sais e compostos utilizados foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade e eram de grau analítico.

##### 3.4.1.1 Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS)

NaCl .....	80 g
KCl.....	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	14,4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2 g  
 Água MiliQ..... qsp 1 L

Quando necessário o pH foi elevado a 7.4 com NaOH 0,1 N. Para uso a solução foi diluída 10 vezes com água deionizada e autoclavada durante 20 min em 120°C.

#### 3.4.1.2 Solução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium (MTT) 5 mg/mL

MTT .....250 mg  
 PBS..... 50 mL

A solução foi exposta ao sonicador até completa dissolução do MTT.

#### 3.4.1.3 Meio de cultura RPMI 1640

Meio RPMI 1640 com glutamina sem bicarbonato.....10.40 g  
 Bicarbonato de Sódio..... 0,67 g  
 HEPES..... 2,38 g  
 Água Deionizada autoclavada ..... q.s 1L

A solução foi incubada a 37°C por 30 min em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O pH foi ajustado para 7.4 com HCl ou NaOH 1N estéril, quando necessário. O meio foi esterelizado em filtros Millipore com poros de 0,2 µm de diâmetro.

#### 3.4.1.4 Solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS)

SDS .....50,0 g  
 Água Destilada ..... q.s. 500 mL

#### 3.4.1.5 Reagente de Griess

##### **Solução A:**

Sulfanilamida..... 500 mg  
 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 5%..... 50 mL

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%:**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ..... 2.94 mL

Água Destilada..... 47.06 mL

**Solução B**

Naftiletlenodiamina..... 0.05 g

Água Destilada..... 50 mL

Estocar ambas as soluções ao abrigo da luz sob refrigeração.

**3.4.1.6 Solução de Turk**

Azul de Metileno ..... 4 g

Ácido Acético Glacial .....30 mL

Água Destilada .....q.s 1 L

Pesar o azul de metileno, acrescentar aos poucos o ácido acético glacial e homogeneizar. Após acrescentar a água, filtrar e estocar em frasco âmbar.

**3.5 Teste comportamental para avaliação da hiperalgesia mecânica**

A hiperalgesia mecânica foi avaliada através da verificação do limiar mecânico utilizando os filamentos de von Frey pelo método do *up and down* descrito anteriormente (CHAPLAN et al., 1994). Para tanto, os camundongos foram colocados em caixas com uma das faces transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame, possibilitando o acesso à pata traseira do animal aos filamentos de von Frey (Stoeling Chicago, E.U. A). Após a adaptação dos animais (em média 2,5 h), foi utilizada uma série de filamentos variando sua massa de 0,008 a 2,0 g (0,008; 0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0 e 2,0 g) aplicados em ordem crescente ou decrescente para determinar 50% do limiar de retirada da pata (limiar 50%) (DIXON, 1991). O primeiro filamento da série a ser testada foi o de 0,4 g na pata posterior direita. Foram feitas 6 avaliações com intervalos de 10 segundos. Na ausência de resposta com um determinado filamento utilizamos outro de maior massa e assim sucessivamente. Havendo retirada ou lambida da pata pelo animal, foi aplicado um filamento de menor massa em um intervalo de 2 min. O limiar de retirada da pata



(50%) foi calculado de acordo com DIXON (1991), e está representado pela seguinte equação:

$$\text{Limiar 50\%} = 10^{\left[ \log \text{ do último filamento} \pm (\text{valor da tabela (Dixon, 1980)} \times 0,4) \right]}$$

Este teste foi inicialmente feito com intuito de selecionar os animais que apresentassem um limiar basal entre os valores de 465 até 1020 mg, para evitar que animais com limiares muito baixos ou muito altos fossem incluídos nos testes. Estes valores de limiar, por serem similares em todos os grupos, são apresentados em todas as figuras como o grupo basal e reúnem a média de todos os animais utilizados. Então, os animais que ficaram entre essa faixa de limiar basal, foram submetidos aos diferentes tratamentos descritos a seguir. Para todos os experimentos a redução do limiar mecânico, avaliada sempre 3 h após a injeção do agente flogístico foi considerado como indicativo de hiperalgisia mecânica.

Em todos os experimentos, tanto os tratamentos quanto os agentes flogísticos foram cuidadosamente aplicadas com uma agulha de 0,3 mm (30G) de 0,5 mL (BD Ultrafine 0,5 mL) para evitar lesão nas patas. Parte dos experimentos foi feito sem o conhecimento prévio dos tratamentos pelo experimentador.

### **3.6 Determinação da Dose Efetiva de Agregatina D**

Após seleção dos animais que ficaram com limiar mecânico basal adequado, foi feita uma curva dose-resposta da Agregatina D, frente a hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina. Para isso, os animais foram pré-tratados com a Agregatina D nas doses de 0,07, 0,7 e 7 ng/pata, diluída em 20 µL de veículo ( Tween 20, 0,1% em solução fisiológica estéril) ou o mesmo volume de veículo. Após 15 min receberam carragenina (300 µg/pata), diluída em 20 µL de solução fisiológica estéril por via intraplantar. O grupo controle recebeu apenas o mesmo volume de veículo (solução fisiológica). O limiar mecânico foi medido 3 h após a injeção de carragenina.

### **3.7 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D sobre a Hiperalgisia Mecânica Induzida Pela Bradicinina e pelas Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CINC-1**

Como já mencionado anteriormente, na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina na pata de roedores, uma bem definida cascata de citocinas precede a liberação dos mediadores finais. Assim, o passo seguinte foi avaliar o efeito antinociceptivo da Agregatina D sobre a hiperalgesia mecânica induzida por Bradicinina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC1. Para isto, os animais receberam Agregatina D (7 ng/pata em 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de veículo (Tween 20 0,1% em solução fisiológica estéril) e após 15 min foi administrada bradicinina (500 ng/pata), TNF- $\alpha$  (1 pg/pata), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/pata) ou CINC1 (10 pg/pata). Todos esses mediadores foram diluídos em de solução salina estéril e o volume injetado também foi de 20  $\mu$ L. O limiar mecânico foi avaliado 3 h após a administração das citocinas ou de bradicinina. Os animais do grupo controle positivo receberam dipirona (320  $\mu$ g/pata, diluída em 20  $\mu$ L de solução fisiológica estéril) 15 min antes da injeção de citocinas ou bradicinina. A dipirona foi selecionada como controle positivo para estes experimentos e também para os subsequentes, pois de maneira similar à Agregatina D, apresenta um efeito analgésico importante mas não apresenta um efeito anti-inflamatório (REZENDE et al., 2008).

### **3.8 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Hiperalgesia Mecânica Induzida Pela Prostaglandina E<sub>2</sub> e dopamina**

A prostaglandina E<sub>2</sub> e a dopamina são exemplos dos mediadores finais responsáveis responsáveis pela indução da sensibilização que ocorre na hiperalgesia mecânica induzida pelas citocinas descritas no item anterior. O próximo passo foi então verificar o efeito do tratamento local com a Agregatina D sobre a redução do limiar mecânico induzido por esses mediadores. De maneira similar, os animais foram selecionados quanto ao limiar mecânico basal e no dia seguinte, os animais selecionados receberam por via intraplantar Agregatina D (7 ng/pata) ou o mesmo volume de veículo (Tween 20 0,1% em solução salina fisiológica) ou dipirona (320  $\mu$ g/pata, diluída em 20  $\mu$ L de solução fisiológica estéril) e após 15 min os animais receberam no mesmo local PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata) ou dopamina ( 3  $\mu$ g/pata). O limiar mecânico foi novamente avaliado após 3h.

### **3.9 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Hiperalgesia Mecânica Induzida Pelo Dibutiril AMPc e Forscolina**

A hiperalgesia mecânica depende, em parte, da ativação da adelinato ciclase com conseqüente aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Assim, em seguida investigamos se a Agregatina D poderia inibir a hiperalgesia induzida pelo ativador da enzima adelinato ciclase a forskolina e pelo análogo permeável do AMPc, o dibutiril-AMPc (DbAMPc).

Para essa etapa de experimentos, o limiar mecânico basal dos animais foi verificado e no dia seguinte os animais foram ambientados e em seguida tratados com Agregatina D (7 ng/pata), dipirona (320 µg/pata) ou veículo (Tween 20 0,1% em 20 µL/pata de solução fisiológica estéril) e após 15 min foi aplicado no mesmo local na pata direita traseira a forskolina (1 µg/pata) ou DbAMPc (5 µg/pata). Após 3h o limiar mecânico foi novamente verificado através dos filamentos de von Frey.

### **3.10 Avaliação do Envolvimento de Canais de Potássio Sensíveis ao ATP no Efeito Antinociceptivo da Agregatina D**

Como descrito anteriormente, o efeito antinociceptivo da dipirona quando aplicada localmente na pata de roedores, envolve a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP. O próximo passo então, foi investigar se ação antinociceptiva da Agregatina D envolveria também a participação desses canais. Deste modo, após a verificação do limiar mecânico basal dos animais, foi aplicado o bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP, a glibenclamida (80 µg/pata) ou o mesmo volume de veículo (solução salina estéril, 20 µL). Após 30 min os animais foram tratados ou com Agregatina D (7 ng/pata) ou com dipirona (320 µg/pata) ou veículo (Tween 20 0,1% em 20 µL de solução fisiológica) e após 15 min deste tratamento receberam prostaglandina E<sub>2</sub> (100 pg/pata). A administração de prostaglandina E<sub>2</sub> como agente flogístico descarta a possibilidade da Agregatina D e da dipirona agirem como inibidores de COX. Após 3 h foi verificado o limiar mecânico através dos filamentos de von Frey.

### **3.11 Efeito da Agregatina D Sobre a Liberação de NO por Macrófagos Peritoneais de Camundongos**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos como previamente descrito (MORETÃO et al., 2003). Resumidamente, a cavidade peritoneal dos camundongos foi lavada com 6 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS), autoclavada

e gelada contendo 5 U/ml de heparina. O lavado peritoneal foi centrifugado a 500 g por 10 min, 4° C. As células foram lavadas duas vezes sendo ressuspensas na primeira lavagem em PBS e na segunda em meio de cultura RPMI 1640 e centrifugadas conforme descrito acima. Ao final da última centrifugação, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contadas em câmara de Neubauer, diluídas apropriadamente e foram colocadas para aderirem em uma placa de cultivo de 96 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço). Depois de 1 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, as monocamadas foram lavadas para remover as células não aderidas. Este procedimento resulta em uma monocamada contendo 95% de macrófagos. Os macrófagos aderidos foram então tratados com Agregatina D (4, 40, 400, 4000 ng/mL) diluída em meio RPMI 1640 contendo ou não LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, 100 ng/mL). Como controle positivo foi usado dexametasona 9 µg/mL. As monocamadas foram incubadas por 4 h a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e então as amostras foram coletadas para avaliação dos níveis de NO. Uma vez retiradas as amostras, as células foram submetidas ao teste de viabilidade celular conforme descrito abaixo.

### 3.12 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada através da redução do sal de tetrazólio, o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromidrato de tetrazólio (MTT) (modificado de MOSMANN, 1983; TADA et al., 1986). O MTT é um corante que é reduzido pelas desidrogenases mitocondriais. Neste método as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio, formando cristais de formazan resultando na cor roxa característica.

Após a coleta das amostras para a medida de NO foi adicionado às células aderidas na placa 100 µL de MTT (5 mg/mL, diluído em tampão PBS. A placa foi então novamente incubada à 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, a reação de redução desencadeada pelo MTT, foi bloqueada com uma solução ácida a 10% de SDS. A solução de SDS também é responsável pela diluição do precipitado de formazan cuja absorbância pode ser medida a 550 nm.

### 3.13 Ensaio Para Dosagem do NO

A dosagem da produção do NO foi feita de acordo com o método descrito por Green e col. (1982). Esse método é baseado na reação de Griess (GREEN, 1982), que quantifica o conteúdo de nitrito, desde que o NO é uma molécula instável e se oxida para nitrito e nitrato. A concentração molar de nitrito na amostra foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

### **3.14 Avaliação do Efeito Antinociceptivo da Agregatina D na Nocicepção Induzida por Agonistas de TRPV1, TRPA1, TRPM8 E ASIC3**

Além de avaliar os efeitos da Agregatina D sobre os diferentes componentes da cascata de mediadores inflamatórios que induz hiperalgesia, decidimos avaliar também se este composto possuía algum efeito direto sobre a ativação de canais iônicos envolvidos com a nocicepção. Para tanto, cada animal foi colocado individualmente dentro de uma caixa transparente de acrílico, com aproximadamente 30 X 30 cm, posicionado sob a bancada em frente a um espelho, para permitir uma visão completa das patas e permaneceu em média 15 min dentro dessas caixas para ambientação. Em seguida, os animais foram tratados com Agregatina D (7 ng/pata) ou veículo (Tween 20, 0,1% em solução fisiológica estéril). Os animais dos grupos controle positivo receberam os antagonistas dos canais iônicos: Vermelho de rutênio (antagonista não seletivo dos canais TRP: 1,5 µg/pata), cânfora (antagonista do canal TRPA1, 250 ng/pata ) ou amilorida (bloqueador de Canais ASIC 3 µg/pata). Após 15 min, os agonistas dos canais iônicos foram aplicados em um volume de 20 µL pela via intraplantar, nas seguintes concentrações: capsaicina (0,1 nmol/pata, agonista TRPV1), cinamaldeído (10 nmol/pata, agonista TRPA1), mentol (2,4 µmol/pata, agonista TRPM8) e solução salina acidificada (Ácido Acético 2% em salina, pH 1,98 20 µL/pata, agonista ASIC). O tempo gasto lambendo a pata injetada foi usado como o índice de comportamento nociceptivo, e foi registrado em um cronômetro durante 5 min (para a capsaicina ou o cinamaldeído) ou durante 20 min (para o mentol e solução salina acidificada). As doses de agonistas e antagonistas foram baseadas em estudos anteriores (ANDRADE et al., 2008; BAGGIO et al., 2012).

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

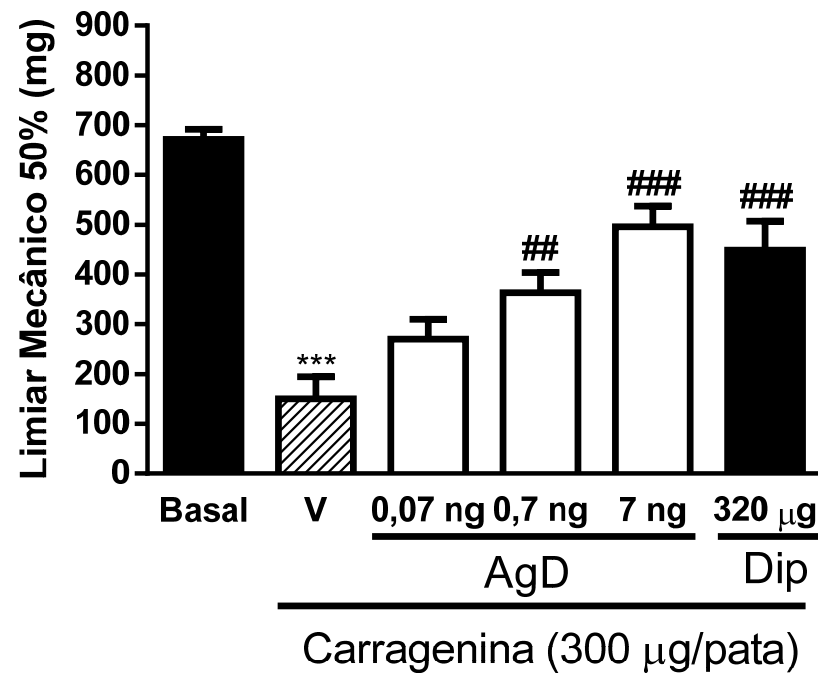
Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações e o nível de significância considerado foi de 5%.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Mecânica Induzida por Carragenina**

A figura 3 mostra que a administração de carragenina na pata dos animais promoveu, após 3 h, uma redução significativa do limiar mecânico em relação ao limiar basal. Em adição, o tratamento local com a Agregatina D, reduziu de maneira dose-dependente a hiperálgia induzida pela carragenina. As doses de 0,7 e de 7 ng foram as que apresentaram significativa inibição de aproximadamente 41 e 66 % quando comparado ao grupo que não recebeu o tratamento. A dose de 0,07 ng/pata não alterou a redução do limiar mecânico induzida por carragenina.

Como a dose de 7 ng foi a que apresentou um efeito bastante evidente esta dose foi selecionada para os experimentos subsequentes. Além disso, como demonstrado na figura 3, a dipirona usada como controle positivo, igualmente foi efetiva na redução da hiperálgia induzida pela carragenina, com uma inibição de 57 % quando comparada ao grupo que não recebeu nenhum tratamento (grupo veículo).

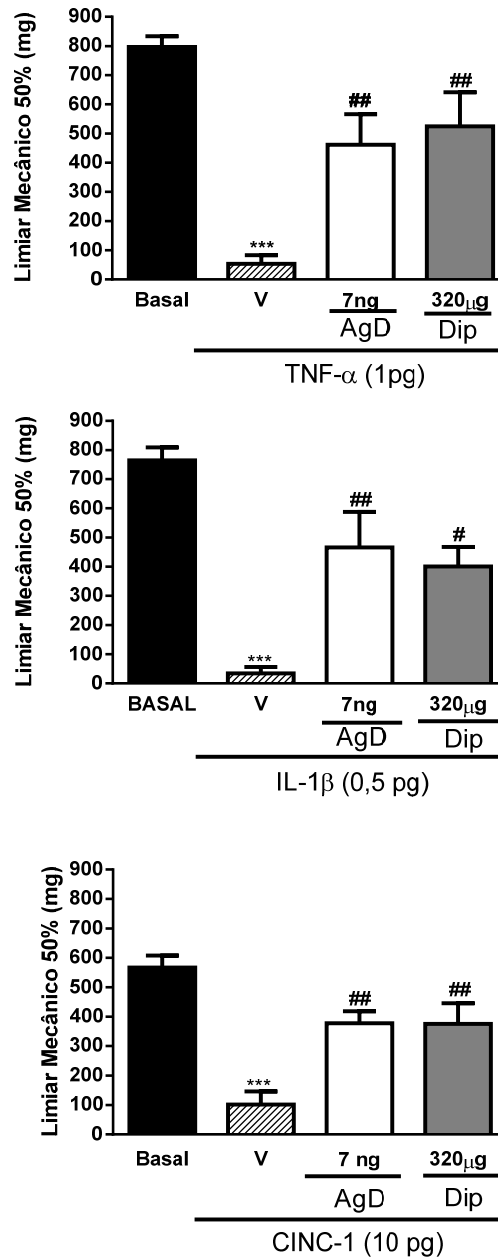


**Figura 3.** Efeito da administração local da Agregatina D (AgD) sobre a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (basal) e então os animais receberam 0,07 , 0,7 ou 7 ng de agregatina D (AgD), 320 µg de dipirona (Dip) ou veículo (V, Tween 20 0,1% em salina, 20 µL) i.pl e após 15 min receberam carragenina (300 µg/pata), também por via i.pl. O limiar mecânico foi avaliado novamente 3 h após a administração de carragenina. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M do limiar mecânico 50% (mg) de 10 a 20 animais. Os símbolos acima das barras mostram as diferenças estatísticas em comparação com a medida basal de todos os animais (\*\*\*) ou com o grupo veículo (## p<0,01, ### p<0,001).



## **5.2 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Induzida Pelas Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CINC-1**

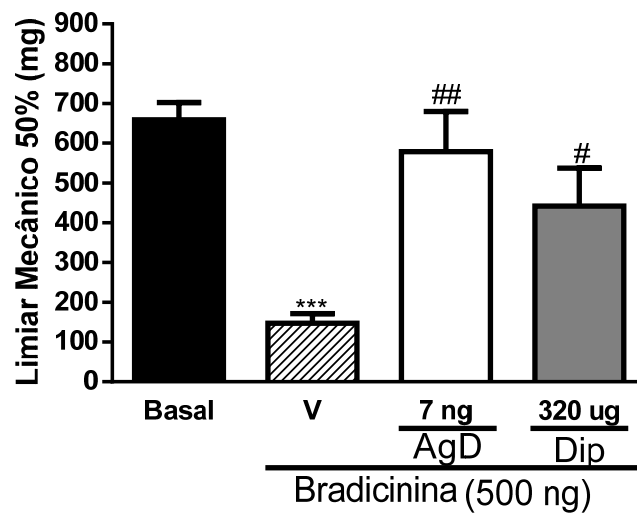
Na figura 4 observamos que as citocinas TNF- $\alpha$  (painel A), IL-1 $\beta$  (painel B) e a quimiocina de ratos CINC-1 (painel C), que é uma análoga da quimiocina derivada dos queratinócitos de camundongos, reduziram o limiar mecânico quando aplicadas pela via intraplantar. O tratamento local com Agregatina D reverteu significativamente a hiperálgia induzida por essas citocinas apresentando uma inibição de 55%, 59% e 59% respectivamente para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1. A dipirona reverteu igualmente a nocicepção induzida por esses mediadores, com uma inibição de 63% para o TNF- $\alpha$ , 50% para a IL-1 $\beta$  e 59% para o CINC-1 (Fig. 4A-C).



**Figura 4.** Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pelas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (Basal) e então os animais foram tratados com AgD (7 ng/pata) ou dipirona (Dip, 320  $\mu$ g/pata) na pata posterior direita ou o volume apropriado do veículo (V, Tween 20 0,1% em solução salina estéril, 20  $\mu$ L) 15 min antes da aplicação do TNF- $\alpha$  (1 pg/pata, painel A), IL-1 $\beta$  (0,5 pg/pata, painel B) e CINC-1 (10 pg/pata, painel C). O limiar foi avaliado novamente 3h após a administração das citocinas. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M do limiar mecânico 50% (mg) de 8 a 10 animais. Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao grupo basal (\*\*\*)  $p < 0,001$  e em relação ao grupo que recebeu veículo/estímulo (##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

### **5.3 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) Sobre a Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Bradicinina**

Como está demonstrado na figura 5, a aplicação de bradicinina, na pata posterior direita dos animais, reduziu o limiar mecânico de retirada quando comparado ao limiar mecânico basal, indicando que houve indução de hiperálgia. O tratamento local dos animais com a Agregatina D (7 ng) reduziu em 84% a hiperálgia mecânica induzida pela bradicinina. De maneira similar, a dipirona reduziu a hiperálgia induzida por esse mediador em aproximadamente 57% .



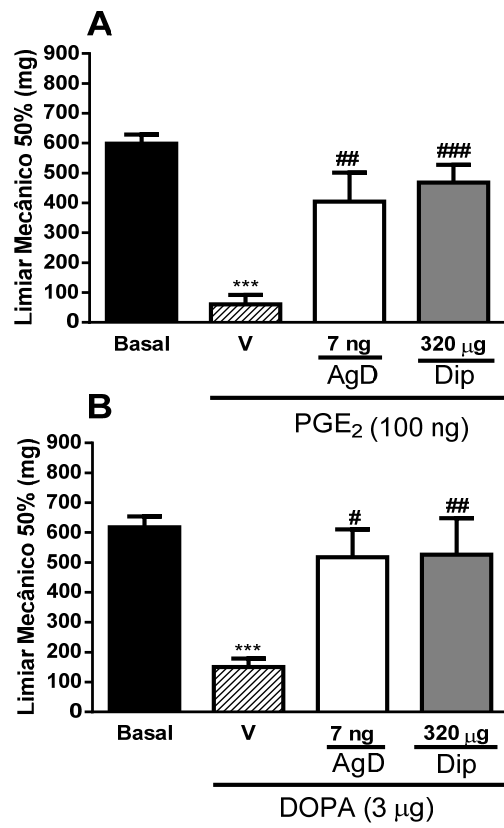
**Figura 5.** Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pela bradicinina. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (Basal) e então os animais foram tratados com Agregatina D (AgD, 7 ng/pata) ou dipirona (Dip, 320 µg/pata) na pata posterior direita ou o volume apropriado do veículo (V, Tween 20 0,1% em solução salina estéril, 20 µL) 15 min antes da aplicação da bradicinina (500 ng/pata). O limiar foi avaliado novamente 3h após a administração da BK. As barras representam a média ± E.P.M do limiar mecânico 50% (mg) de 7 a 8 animais. Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao grupo basal (\*\*\*)  $p < 0,001$  e em relação ao grupo que recebeu veículo/estímulo (##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ ).

#### **5.4 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) Sobre a Hiperalgisia Mecânica Induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub> e Dopamina**

Como tanto a IL-1 $\beta$  quanto o CINC-1 promovem redução do limiar nociceptivo por induzirem a liberação de prostanóides, nosso passo seguinte foi verificar se o composto poderia reverter também a hiperalgisia induzida pela aplicação de prostaglandina E<sub>2</sub>. Em seguida, verificamos também qual seria o efeito do composto na hiperalgisia induzida pela dopamina, uma amina simpática cuja liberação também pode ser induzida por CINC-1.

A aplicação de prostaglandina E<sub>2</sub> na pata dos animais reduziu o limiar mecânico de retirada, quando comparado ao limiar mecânico basal dos animais (Fig. 6A). Por sua vez, o tratamento local dos animais com a Agregatina D inibiu em 64% a hiperalgisia mecânica induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>. A dipirona, utilizada como controle positivo, também inibiu a hiperalgisia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>, com efeito aproximado de 76% (Fig. 6A).

A aplicação de dopamina também reduziu significativamente o limiar mecânico de retirada da pata dos animais quando comparado ao limiar basal (fig. 6B). Como demonstrado na figura 6B, o tratamento local da pata direita posterior com a Agregatina D também inibiu significativamente a hiperalgisia mecânica induzida pela dopamina, sendo essa inibição de 78%. A dipirona inibiu em aproximadamente 80% a hiperalgisia mecânica induzida pela dopamina (Figura 6B).



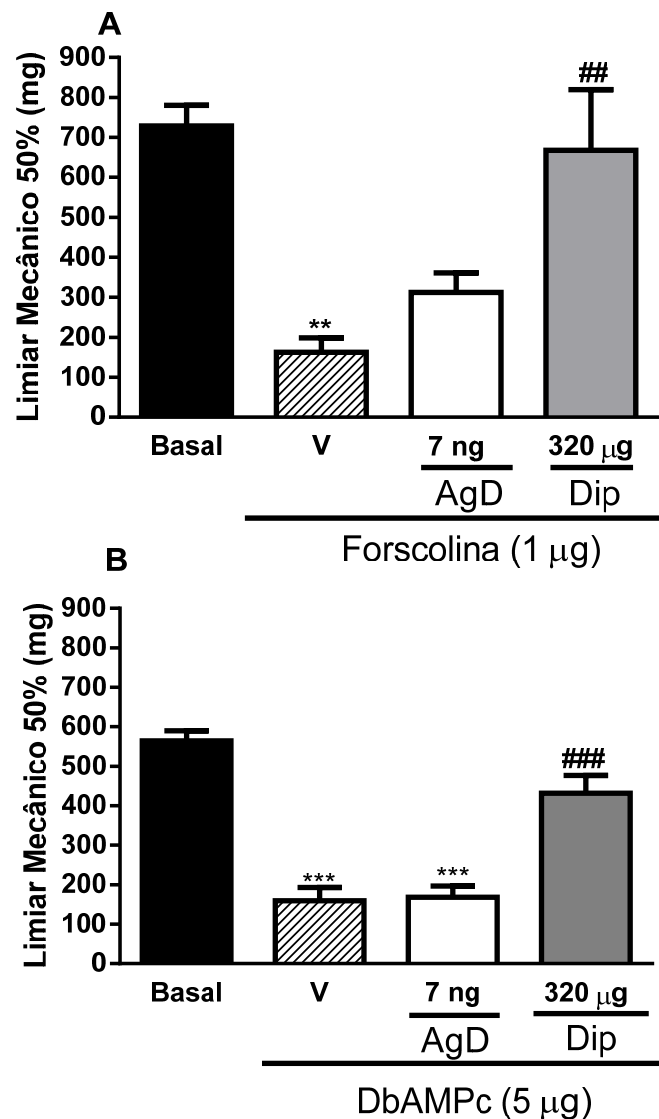
**Figura 6.** Efeito da administração local de Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida pela Prostaglandina E<sub>2</sub> e pela dopamina. O limiar mecânico foi avaliado para cada animal (Basal) e então os animais foram tratados com Agregatina D (Ag D 7 ng/pata) na pata direita posterior ou dipirona (Dip, 320 µg/pata) ou o volume apropriado do veículo (V, Tween 20 0,1% em solução salina estéril, 20 µL) 15 min antes da aplicação da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 100 ng/pata, painel A) ou da dopamina (DOPA, 3 µg/pata, painel B). O limiar foi avaliado novamente 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub> ou de DOPA. As barras representam a média ± E.P.M do limiar mecânico 50% (mg) de 7 a 11 animais. Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas em relação ao grupo basal (\*\*\*) e em relação ao grupo que recebeu veículo/estímulo (#, p < 0,05, ## p < 0.01, ### p < 0.001).

### **5.5 Efeito do Tratamento Local com Agregatina D (AgD) na Hiperálgia Mecânica Induzida Pela Forscolina e Pelo Dibutilil - Monofostato Cíclico de Adenosina**

Em virtude da Agregatina D ter reduzido a hiperálgia induzida por prostaglandina  $E_2$ , bradicinina e dopamina, resolvemos investigar seu efeito sobre os eventos posteriores a ativação dos respectivos receptores destes mediadores ou seja, a ativação de adenilato ciclase e a posterior formação de AMPc. Para isto, utilizamos um ativador da AC, a forscolina e um análogo permeável do segundo mensageiro AMPc, o dbAMPc.

A ativação da AC pela forscolina reduziu significativamente o limiar mecânico na pata dos animais. Porém o pré-tratamento dos animais com Agregatina D não preveniu a hiperálgia induzida pela forscolina (Fig. 7A). Contrastando com esta resposta, a dipirona, na mesma dose utilizada com os outros mediadores, inibiu significativamente (em aproximadamente 89%) a hiperálgia induzida pela forscolina. O grupo de animais tratados apenas com os veículos da forscolina (DMSO 5% em salina) e Agregatina D ( Tween 20 0,1% em salina estéril) não foram significativamente diferentes do grupo basal (dados não mostrados).

De maneira similar a forscolina, como demonstrado na figura 7B , o DbAMPc reduziu o limiar mecânico na mesma magnitude que o fizeram a prostaglandina $E_2$ , a bradicinina e a dopamina. Porém, a Agregatina D foi inefetiva em reverter a hiperálgia induzida por este segundo mensageiro, enquanto que o controle positivo dipirona, na mesma dose utilizada para os outros mediadores reverteu significativamente a hiperálgia induzida pelo DbAMPc.

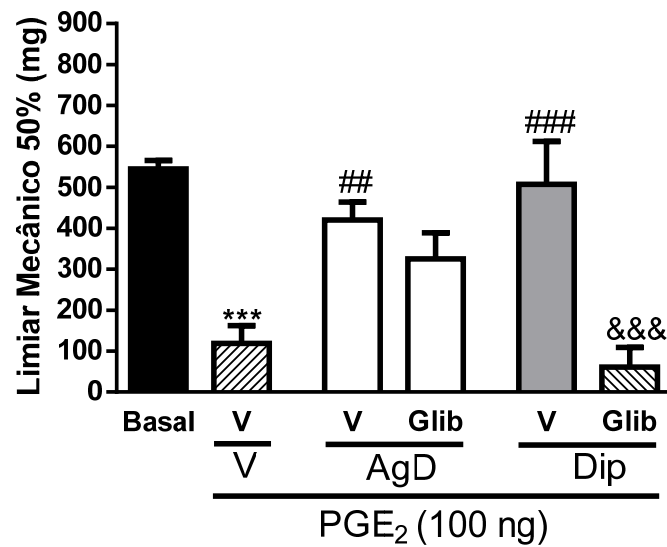


**Figura 7.** Efeito do tratamento local com Agregatina D (AgD) na hiperalgesia mecânica induzida por forscolina e DbAMPc. O limiar foi avaliado para cada animal (basal) e então os animais receberam Agregatina D (AgD, 7 ng/pata) ou dipirona (Dip, 320 µg/pata) ou o volume apropriado do veículo (V, Tween 20 0,1% em salina estéril, 20 µL) 15 min antes da aplicação de forscolina (1 µg/pata, painel A) ou de DbAMPc (5 µg/pata, painel B). O limiar foi avaliado novamente após 3 h. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M do limiar mecânico 50% (mg) de 4-7 animais para o painel A e de 15-16 animais para o painel B. Os símbolos acima das barras representam diferenças significativas em relação ao grupo basal (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) e em relação ao grupo que recebeu veículo/estímulo (##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0.001$ ).



## **5.6 Efeito do Bloqueio de Canais de Potássio Sensíveis ao ATP Sobre o Efeito Antinociceptivo da Agregatina D (AgD)**

A figura 8 demonstra novamente que a aplicação local de prostaglandina E<sub>2</sub> reduziu o limiar mecânico de retirada da pata dos animais quando comparado ao limiar mecânico basal, indicando portanto, que houve a indução da hiperalgesia. O tratamento local com Agregatina D ou com o controle positivo dipirona, de maneira similar ao que foi demonstrado anteriormente reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>. O pré-tratamento local da pata direita posterior dos animais com o bloqueador seletivo dos canais de potássio sensíveis ao ATP, a glibenclamida 30 min antes da administração de dipirona reverteu significativamente o efeito antinociceptivo deste analgésico (Figura 8). Entretanto, o mesmo efeito não foi observado com a Agregatina D, cujo efeito antinociceptivo não foi modificado pela aplicação local da glibenclamida.

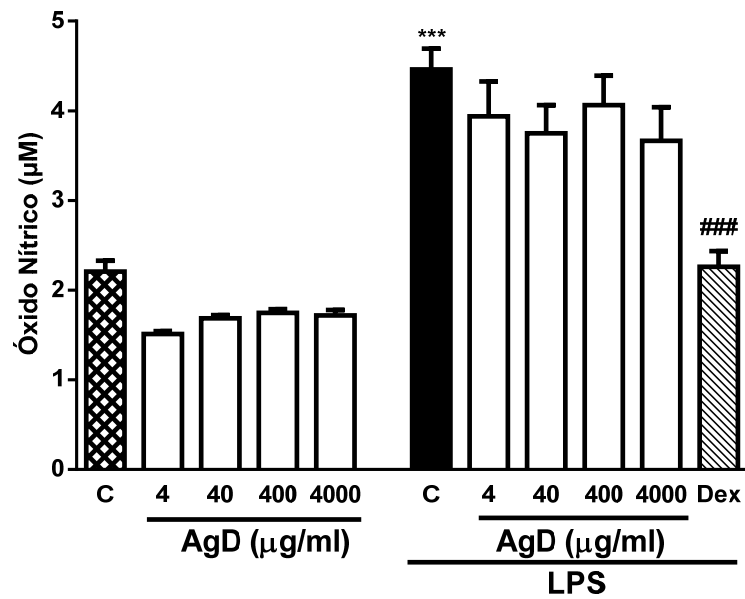


**Figura 8.** Efeito do bloqueador de canais de potássio, glibenclamida, sobre o efeito antinociceptivo da Agregatina D (AgD). Os animais foram tratados com o bloqueador de canal de  $K^+$  glibenclamida (Glib, 80  $\mu$ g/pata) ou o mesmo volume do veículo (V, Tween 80 1% em Salina Estéril). Após 30 min, os animais receberam Agregatina D (AgD, 7 ng/pata), dipirona (Dip, 320  $\mu$ g/pata) ou veículo (V) seguido por uma injeção de Prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ , 100 ng/pata), 15 min depois. O limiar basal foi avaliado antes de cada injeção. O limiar mecânico foi avaliado novamente 3h após a injeção do estímulo nociceptivo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M do limiar mecânico de 5-10 animais. Os símbolos acima das barras representam diferenças significativas em relação ao limiar mecânico basal (\*\*\*)  $p < 0.001$ ), em relação ao grupo tratado com V/V (##  $p < 0.01$  e ###  $p < 0.001$ ) ou ao grupo tratado com V/Dip (&&&  $p < 0.001$ ).

### **5.7 Efeito da Agregatina D (AgD) Sobre a Liberação de NO por Macrófagos Peritoneais**

A produção basal de NO (medido como nitrato e nitrito) pelos macrófagos peritoneais não foi significativamente alterada pelo tratamento das células com a Agregatina D.

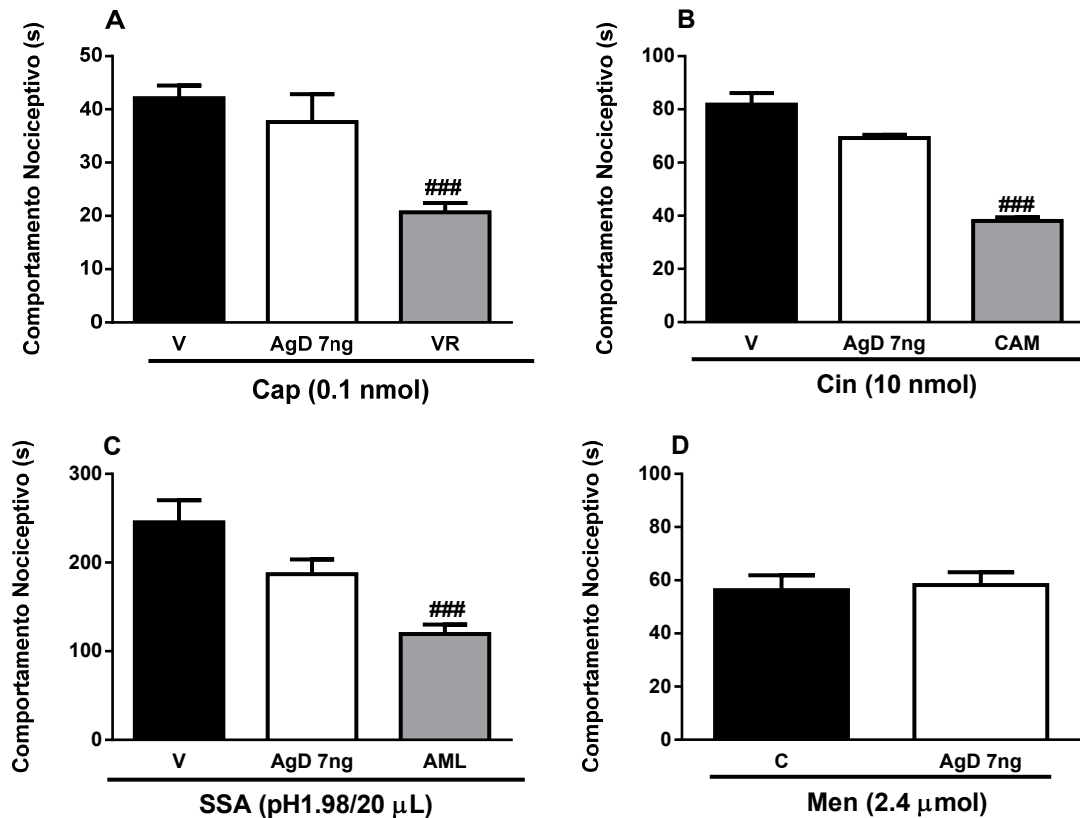
O LPS aumentou de maneira significativa a produção de NO, mas o tratamento das células com Agregatina D não modificou essa produção (Figura 9). Alternativamente, o tratamento das células com o glicocorticóide Dexametasona aboliu o aumento na produção do NO induzido pelo LPS (Figura 9). Nenhum dos tratamentos alterou a viabilidade celular que foi sempre superior a 95%.



**Figura 9.** Efeito da Agregatina D (AgD) na liberação de NO por macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais ( $10^6$  células/poço) foram tratados com Agregatina D (AgD, 4-4000 ng/mL) ou com RPMI 1640 (controle, C) na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL). As células do grupo controle positivo foram tratadas com dexametasona (Dex, 9 µg/mL) na presença de LPS. A produção de NO foi quantificada através do método de Griess 4 h após a estimulação com LPS. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M de Nitrito/Nitrato ( $\mu$ M) em sextuplicata. Os símbolos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (C), meio RPMI 1640 (\*\*\* $p < 0.001$ ), ou com o grupo tratado com LPS (###  $p < 0.001$ ).

### **5.8 Efeito da Agregatina D (AgD) Sobre A Nocicepção Induzida pela Ativação dos Receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASIC3**

A aplicação local dos agonistas dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASIC3, respectivamente a capsaicina (Figura 10A), o cinamaldeído (Figura 10B), a solução salina acidificada (Figura 10C) e o mentol (Figura 10D) induziram nocicepção nos animais que foi quantificada pelo tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada (Figura 10). O pré-tratamento local das patas dos animais com os antagonistas dos receptores TRPV1, TRPA1 e ASIC3, respectivamente o vermelho de rutênio (Figura 10A), a cânfora (Figura 10B) e a amilorida (Figura 10C) preveniram significativamente o comportamento nociceptivo observado pela aplicação dos agonistas desses canais. Entretanto, o tratamento local com a Agregatina D não foi capaz de prevenir o efeito comportamental induzido pela aplicação dos agonistas dos receptores TRPV1, TRPA1, ASIC3 e TRPM8 (Figuras 10A-D).



**Figura 10.** Efeito da Agregatina D (AgD) no comportamento nociceptivo induzido pela aplicação da capsaicina, cinamaldeído, solução salina acidificada e mentol. Os animais foram localmente tratados com a Agregatina D (AgD, 7ng/pata), vermelho de rutênio (VR, 1,5 µg/pata), cânfora (CAM, 250 ng/pata), amilorida (AML, 3 µg/pata) ou veículo (V, solução fisiológica estéril, 20 µL/pata), 10 min antes da aplicação da capsaicina (Cap, 0,1 nmol/pata, painel A), cinamaldeído (Cin, 10 nmol/pata, painel B), solução salina acidificada (SSA, pH1.98, 20 µL, painel C) ou mentol (Men, 2,4 µmol/pata, painel D) na pata posterior direita. O comportamento nociceptivo foi avaliado durante 5 min nos painéis A e B e por 20 min nos painéis C e D. Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo (s) que os animais permaneceram executando o comportamento nociceptivo de um grupo de 5 a 8 animais. Os símbolos acima das barras representam diferença significativa em relação ao grupo tratado com veículo (###  $p < 0,001$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo desenvolvido com a Agregatina D, um composto isolado da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico dos bulbos da *S. aggregata*, demonstrou que este composto possui uma importante atividade antinociceptiva por mecanismos que parecem ser diferentes da dipirona e dos AINEs.

Estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório e ainda não publicados (anexo 1), demonstraram que o extrato etanólico da *S. aggregata*, promoveu significativa redução do comportamento nociceptivo induzido pela formalina na fase inflamatória. Foi observado também que o mesmo extrato quando dado por via oral aos animais promoveu significativa redução dose-dependente da hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina na pata posterior direita (anexo 1). Esse efeito antinociceptivo obtido com o extrato etanólico da *Sinningia aggregata* parece ser somente periférico, uma vez que não produziu nenhuma alteração comportamental dos animais no teste da placa quente nem no teste que avalia a performance locomotora. Posteriormente, foi ainda observado que a ação antinociceptiva do extrato etanólico estava concentrada na fração acetato de etila de onde foi isolado um composto denominado de Agregatina D (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>). O pré-tratamento com a Agregatina D por via oral (0,21 mg/Kg), reverteu significativamente a nocicepção inflamatória induzida pela aplicação intraplantar de formalina aos animais, sendo o mesmo resultado observado na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. Estes dados nos instigaram a continuar a investigar a atividade antinociceptiva da Agregatina D.

Neste estudo foi utilizado o teste de von Frey para quantificar a hiperalgesia mecânica induzida por diferentes mediadores aplicados diretamente nos animais sadios.

Este teste é ainda uma maneira simples, porém segura para demonstrar que a aplicação dos mediadores liberados durante o processo inflamatório contribuem para promover a redução do limiar de retirada nas patas (BARROT, 2012). Este teste já foi utilizado clinicamente para avaliar alodinia, especialmente nos casos de dor neuropática, sendo que em modelos feitos com animais é um teste que apresenta boa reprodutibilidade e padronização (BARROT, 2012, CHAPLAN et al., 1994). Embora os testes de von Frey feitos em camundongos apresentem grande variabilidade nos valores de retirada registrados, o bom desempenho do teste

depende de uma série de fatores, além do protocolo e do tipo de filamento que foi testado. No modelo aqui reproduzido, utilizamos o paradigma do *up-down* em que a massa dos filamentos testados oscilou próximo ao limiar de resposta de cada animal, permitindo assim uma comparação entre o limiar de retirada basal com o limiar de retirada após a sensibilização da pata testada (DIXON et al., 1991, CHAPLAN et al., 1994). Esta metodologia tem sido utilizada em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (MORI et al., 2011, BARBOSA et al., 2013) e por outros grupos (YI et al., 2014, XU et al., 2013).

Utilizando portanto o modelo descrito acima, avaliamos a dose efetiva de Agregatina D sobre a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina. A administração local de Agregatina D reduziu de maneira dose-dependente a hiperalgesia induzida pela carragenina. Estes dados confirmam nossos resultados anteriores quando à propriedade antinociceptiva da Agregatina D administrada por via oral. A Agregatina D reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina para valores similares àqueles observados após a administração do controle positivo selecionado para este estudo, a dipirona. A dipirona foi selecionada para este estudo como controle positivo por possuir uma excelente ação analgésica, sendo capaz de bloquear inclusive a hiperalgesia induzida por AMPc através de mecanismos dependentes da via L-arg/NO/AMPc (DUARTE et al., 1992). Deste modo, este controle poderia ser conveniente em diversas etapas do estudo.

Os compostos de origem natural são fontes importantes para a escolha e desenvolvimento de novas drogas analgésicas, devido aos efeitos colaterais decorrentes das drogas disponíveis na clínica. Diversos estudos pré-clínicos tem confirmado essa tendência, principalmente para compostos com ação preferencial nos tecidos inflamados. O alcalóide cassina, isolado das flores, frutos e folhas de *Senna spectabilis* inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina quando administrado na dose de 10 µg/pata (SILVA et al., 2012). Um outro composto, o velutinol A isolado dos rizomas de *Mandevilla velutina* também reverteu a hiperalgesia induzida pela carragenina (MATTOS et al., 2006) na dose de 3,62 µg/pata. Além disso, tem sido descrito na literatura a atividade antinociceptiva para compostos similares à Agregatina D, ou seja naftoquinonas, como a vitamina K<sub>2</sub> (menatetrenone) que bloqueou a fase inflamatória do teste da formalina e também foi efetiva no teste da pressão na cauda em camundongos (ONODERA et al., 2000). Neste sentido, as doses de Agregatina D necessárias para se observar um efeito



analgésico na pata foram significativamente inferiores à estas citadas para estes compostos (7 ng /pata), sugerindo que este composto possui um importante efeito antinociceptivo e uma vez determinada a dose efetiva para o efeito antinociceptivo do composto, optamos por buscar evidências sobre o seu modo de ação.

Como previamente descrito uma bem definida cascata de citocinas é responsável por induzir a hiperalgesia mecânica após a injeção de carragenina em camundongos (CUNHA et al., 2005). Deste modo, o passo subsequente neste estudo foi avaliar o efeito da Agregatina D sobre a hiperalgesia induzida por estas citocinas.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica importante na resposta de defesa contra patógenos, capaz de interferir com a sobrevivência celular, induzindo proliferação, diferenciação e também apoptose (WU et al., 2004). Esta citocina é rapidamente secretada pelos macrófagos em resposta a um estímulo inflamatório e desencadeia a liberação de outras citocinas e fatores de crescimento (JIN & GERAU, 2006). A hiperalgesia mecânica induzida tanto pela carragenina como por LPS em camundongos depende da ativação do receptor TNFRI (e portanto da liberação desta citocina) (CUNHA et al., 2005, CALI et al., 2014). Uma vez ativado, esse receptor promove o recrutamento de complexas vias intracelulares que iniciam por meio de proteínas adaptadoras conhecidas como Fatores Associados ao Receptor de TNF- $\alpha$  (TRAFs) (WU et al., 2004). Os efetores localizados abaixo dessa cascata de ativação de enzimas intracelulares iniciada pela ativação do receptor TNFRI, incluem o fator nuclear Kappa B. Este por sua vez induz a transcrição de mediadores pró-inflamatórios, tais como a NOS<sub>2</sub>, a COX<sub>2</sub> e outras citocinas que serão importantes para hiperalgesia e para outros eventos inflamatórios (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996).

Já a IL-1 $\beta$  é um peptídeo reconhecido por regular a resposta imune e inflamatória, produzida e secretada principalmente por macrófagos e monócitos, mas também por fibroblastos, células endoteliais e epidermais (STYLIANOU & SAKLATVALA, 1998). Em condições de lesão e inflamação, essa citocina induz muitas respostas biológicas, atuando via receptor IL-1RI (GABAY et al., 2010). Tais respostas incluem o recrutamento das células inflamatórias para o local lesionado pela indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Além disso, essa citocina induz a produção de várias enzimas, tais como a fosfolipase A<sub>2</sub>, a COX<sub>2</sub> e a NOS<sub>2</sub>, levando a produção dos mediadores inflamatórios tais como a

prostaglandina E<sub>2</sub> e o NO, que também contribuem para sensibilizar os nociceptores (GABAY et al., 2010). De maneira similar ao TNF- $\alpha$  esses efeitos decorrem da ativação de proteínas quinases específicas que modulam fatores de transcrição, como o fator nuclear Kappa B.

Por outro lado, quimiocina CINC-1 representa um elo de ligação entre a lesão e o sistema imune, pois dentre outros efeitos, sua principal função parece ser promover o recrutamento dos leucócitos até o local inflamado (VERRI et al., 2006). Essa quimiocina é análoga a IL-8 humana e a quimiocina derivada dos queratinócitos em camundongos (o KC), sendo que tanto a IL-8 humana quanto o CINC-1 (CXCL<sub>1</sub>) murino ligam-se no mesmo receptor CXCR<sub>2</sub> e promovem nocicepção por induzirem a liberação de aminas simpáticas no local inflamado (CUNHA et al., 1991, LORENZETTI et al., 2002, do VERRI et al., 2006). Muitos autores atribuem o efeito das quimiocinas a efeitos independentes da síntese de prostanóides. Isto ocorre provavelmente porque algumas destas citocinas são pirogênicas e promovem uma resposta febril que não pode ser bloqueada pelos clássicos inibidores da ciclooxigenase, como a IL-8 (ZAMPRONIO et al, 1994) e a proteína inflamatória derivadas de macrófagos (DAVATELIS et al., 1989). Com relação à dor, a IL-8 e o CINC-1 reforçam esta idéia, uma vez que a hiperalgesia induzida por estes mediadores não foi bloqueada por inibidores da cicloxigenase em ratos, mas foram responsáveis pela indução do componente simpático da hiperalgesia (CUNHA et al., 1991; LORENZETTI et al., 2002). No entanto, em camundongos, as quimiocinas, e particularmente o KC, parecem induzir uma resposta que é tanto dependente de prostaglandinas como da liberação de aminas simpáticas, como descrito anteriormente (CUNHA et al. 2005).

Corroborando esses estudos, demonstramos no presente estudo que a aplicação dessas citocinas na pata posterior direita dos animais reduziu o limiar mecânico em uma proporção similar àquela observada para a carragenina nas doses utilizadas. A Agregatina D reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida por estas citocinas. Estes dados sugerem primariamente que a Agregatina D estaria atuando em algum evento posterior à liberação destas citocinas e ativação dos receptores discutidos acima. Além disso, podemos sugerir que a Agregatina D também não estaria inibindo a liberação destas citocinas, embora esta suposição necessite de maiores comprovações. Por fim, os dados obtidos com a redução da hiperalgesia induzida pelas citocinas por Agregatina D sugerem ainda que este

composto seja capaz de inibir ambos os componentes da hiperalgesia mecânica, prostaglandinas e simpático, sugeridos por CUNHA et al., (2005).

A bradicinina é outro mediador liberado intra e extra vascularmente durante um insulto inflamatório que está amplamente envolvida com os mecanismos de indução de dor (COUTURE et al., 2001, STERANKA et al., 1988 ). Os efeitos biológicos promovidos pela bradicinina dependem da ativação do receptor  $B_2$  que nos neurônios nociceptivos, é constitutivamente expresso. A ativação deste receptor promove a liberação de segundos mensageiros, como o AMPc, o DAG e o IP3, que via ativação da PKA e da PKC induzem ao aumento da excitabilidade dos nociceptores (PETHO & REEH, 2012) através da liberação de prostanóides e produtos da via da lipooxigenase (FERREIRA, 1993; KHASAR et al., 1998; PETHO et al., 2001; TAIWO & LEVINE, 1988). De fato, a inibição da COX<sub>1</sub> e da lipooxigenase promoveu redução do comportamento nociceptivo induzido pela bradicinina (PETHO & REEH, 2012). Além disso, a bradicinina, através da ativação da PKA pode aumentar a excitabilidade dos nociceptores por potencializar as correntes de cátions induzidas pelos canais TRP (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2012).

Sabe-se que a hiperalgesia mecânica induzida pela bradicinina na pata dos camundongos naïve, diferentemente da carragenina, independe da liberação de uma cascata de citocinas e a via de sinalização envolvida com a hiperalgesia depende principalmente da ativação dos receptores  $B_2$  (CUNHA et al., 2007).

No presente estudo, observamos que a bradicinina reduziu significativamente o limiar de retirada da pata dos animais quando comparado ao limiar basal, confirmando então seus efeitos sensibilizantes observado em estudos anteriores (CUNHA et al., 2007, CUNHA et al., 2005). A Agregatina D inibiu significativamente a hiperalgesia induzida pela bradicinina, sendo o efeito observado superior a inibição da hiperalgesia induzida pelas citocinas.

Estes dados em conjunto sugerem que a Agregatina D provavelmente atuaria reduzindo os efeitos mediados pela bradicinina por prevenir a sensibilização dos nociceptores pelos mediadores finais liberados após a liberação deste peptídeo, tais como as aminas simpáticas e os prostanóides. Ela também poderia promover seu efeito antinociceptivo por interferir com um dos seus alvos intracelulares gerados em resposta a ativação dos receptores  $B_2$  periféricos.

Alem disso, durante o processo inflamatório tem sido descrito que ocorre a liberação do ATP das células lesionadas no local e que esse mediador contribui para promover o estabelecimento da hiperalgesia, via ativação dos receptores  $P_2X_3$  e  $P_2X_{2/3}$  expressos nos neurônios sensitivos periféricos, participando do processo de despolarização por aumentar o influxo de  $Ca^{2+}$  e de  $Na^+$  para dentro da célula (PRADO et al., 2013, BURNSTOCK, 2000). Estes estudos demonstraram ainda que a ativação desses receptores purinérgicos é essencial para o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela carragenina (PRADO et al., 2013). Além disso, os estudos também indicam que a liberação do ATP durante o processo inflamatório não depende da liberação das citocinas inflamatórias, mas depende da liberação da bradicinina, uma vez que o antagonismo dos receptores  $P_2X_3$  e  $P_2X_{2/3}$  preveniu de maneira dose dependente a hiperalgesia induzida por esta cinina (FUSARO et al., 2010). Portanto, a atuação nestes receptores purinérgicos também é uma possibilidade.

Em conjunto, os dados apresentados até o momento sugerem que a ação da Agregatina D situa-se em algum evento após a liberação dos mediadores clássicos da hiperalgesia inflamatória, entre eles as citocinas e a bradicinina. Até o momento, não podemos descartar ainda a possibilidade da Agregatina D estar bloqueando inespecificamente receptores destas citocinas, os receptores  $B_1$  e  $B_2$  de bradicinina ou mesmo os receptores purinérgicos que são ativados após a liberação de bradicinina e ATP. Estas hipóteses poderiam ser melhor avaliadas por meio de outras técnicas, como estudos de ligação ao receptor.

No entanto, outra maneira de avaliar estas possibilidades seria verificar se a Agregatina D reduz a hiperalgesia induzida pelos mediadores formados após a liberação de citocinas e bradicinina, mais especificamente as prostaglandinas (formadas via COX-2) e as aminas simpáticas.

Deste modo, o passo seguinte foi verificar se esta naftoquinona reduziria a nocicepção induzida por estes mediadores finais, tendo como representantes destes, a dopamina e a prostaglandina  $E_2$ .

A prostaglandina  $E_2$  é o prostanóide que tem maior impacto na indução das vias de sinalização, que culminam com a hiperalgesia durante um insulto inflamatório (KAWABATA, 2011). Após a lesão ter ocorrido, os mediadores liberados em resposta ao estímulo lesivo, como por exemplo a bradicinina, também promovem ativação dos neurônios pós-ganglionares simpáticos, resultando em aumento dos

níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e liberação das aminas simpáticas próximo ao local lesionado (PETHO & REEH, 2012, KHASAR et al.,1999). Em adição, tem sido demonstrado que a inibição da COX 1 e 2 pelos AINEs, não é suficiente para inibir completamente a hiperalgesia induzida pela carragenina (CUNHA et al., 1991, KHASAR et al.,1999). Porém, a depleção das aminas simpáticas por meio da guanetidina, associada a um AINE, foi capaz de bloquear a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, comprovando que ambas as vias, tanto a dos prostanóides quanto a das aminas simpáticas são necessárias para reduzir o limiar mecânico da pata dos animais (CUNHA et al., 2005). O tratamento dos animais com Agregatina D na dose previamente selecionada, reverteu de maneira significativa a hiperalgesia induzida pela prostaglandina  $\text{E}_2$  e por dopamina, restaurando o limiar próximo ao limiar basal. Esse resultado tem algumas implicações importantes. Em primeiro lugar, estes dados excluem a possibilidade de que o efeito antinociceptivo da Agregatina D esteja relacionado com a inibição da COX e consequente liberação deste prostanóide uma vez que a naftoquinona é capaz de bloquear mesmo a hiperalgesia da prostaglandina já formada. Em segundo lugar, estes dados colocam a Agregatina D entre os analgésicos que podem bloquear o componente simpático da hiperalgesia inflamatória como a dipirona, utilizada como controle positivo em nosso experimento e bastante efetiva em reduzir a hiperalgesia induzida por ambos os estímulos (DUARTE et al., 1992, LORENZETTI & FERREIRA, 1985). Esta propriedade não é compartilhada pela grande maioria das drogas do tipo da aspirina (FERREIRA,1993 a e b). Além disso, estes dados também são úteis para descartar a possibilidade levantada acima de que a Agregatina D estivesse agindo inespecificamente em receptores de citocinas e ou bradicinina. Se este fosse o caso, a hiperalgesia induzida por prostaglandinas e dopamina não seria inibida. Por fim, estes dados nos levaram a avaliar se a Agregatina D poderia estar impedindo a ligação destes agonistas aos seus receptores ou algum evento subsequente (e possivelmente comum) à sua ativação.

A dopamina e a prostaglandina  $\text{E}_2$  ao ligarem-se nos receptores acoplados a proteína G, dos subtipos  $\text{D}_1$  e  $\text{EP}_2/\text{EP}_4$  respectivamente, expressos nos neurônios nociceptivos, promovem ativação da adelinato ciclase induzindo ao aumento do segundo mensageiro AMPc, que ao ativar a PKA, induz ao aumento da excitabilidade da membrana neuronal (SOUTHALL & VASKO, 2001, CUNHA et al., 2005).

Portanto, o passo seguinte foi investigar o efeito da Agregatina D sobre a hiperalgesia induzida por um ativador da adenilato ciclase, a forskolina, e pelo análogo permeável do AMPc, o dbAMP. Nossos resultados demonstram que tanto a forskolina quanto o dbAMP induziram uma hiperalgesia mecânica na mesma magnitude daquela observada para a prostaglandina E<sub>2</sub> e a dopamina. De maneira surpreendente a Agregatina D foi inefetiva em reduzir a hiperalgesia induzida tanto por forskolina como por dbAMPc. Como era esperado e diferentemente do que ocorreu com a Agregatina D, a dipirona foi efetiva em reduzir a hiperalgesia induzida por ambos os estímulos corroborando dados de literatura (DUARTE et al.,1992). Deste modo, podemos sugerir que o alvo de ação da Agregatina D situa-se entre os fenômenos que ocorrem após a ativação dos receptores acoplados à proteína G, ativação da adenilato ciclase e formação de AMPc. Ainda, esta ação não parece estar associada a eventos posteriores à formação de AMPc como ativação da PKA, que como previamente descrito, atua fosforilando receptores e canais iônicos para induzir à sensibilização na dor inflamatória (SOUTHALL & VASKO, 2001, NARUMIYA, 2009 ).

A dipirona é uma das drogas analgésicas mais utilizadas no Brasil, porém como anteriormente mencionado apresenta fraca ação anti-inflamatória (CUNHA et al., 2004). Apesar de não ter seu mecanismo de ação totalmente esclarecido, há várias hipóteses tentando elucidar o possível alvo da ação antinociceptiva da dipirona. Um desses estudos demonstra que quando aplicada na pata de roedores, a dipirona promove efeito antinociceptivo dose-dependente na hiperalgesia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>, por induzir a liberação local de NO, sendo um mecanismo dependente da abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (ALVES & DUARTE, 2002). No entanto, como a Agregatina D, diferentemente da dipirona, não inibiu a hiperalgesia induzida pelo dbAMPc e pela forskolina, nossos dados indicam que é possível que este composto não compartilhe do mesmo mecanismo de ação da dipirona. Entretanto, para confirmar esta suposição investigamos se a ativação de canais de potássio estaria envolvida com o efeito antinociceptivo da Agregatina D. O pré-tratamento dos animais com o bloqueador seletivo dos canais de potássio sensíveis ao ATP, a glibenclamida, não modificou a ação antinociceptiva da Agregatina D. Contrariamente, a glibenclamida reverteu de maneira significativa o efeito antinociceptivo da dipirona administrada localmente, confirmando os resultados anteriores (ALVES & DUARTE, 2002). Outras hipóteses que delineiam a

ação antinociceptiva da dipirona e que podem portanto estar envolvidas no efeito antinociceptivo da Agregatina D apontam para o envolvimento de receptores CB<sub>1</sub> para endocanabinóides. Essa via foi sugerida por SANTOS e colaboradores (2014) tendo por base que o efeito antinociceptivo periférico de um dos metabólitos ativos da dipirona (4 aminoantipirina) na hiperalgisia induzida por Prostaglandina E<sub>2</sub> foi revertido de maneira dose-dependente pela administração local de um antagonista seletivo para o receptor CB<sub>1</sub> de endocanabinóides. Esses dados levantam outros possíveis alvos para a Agregatina D, embora estudos mais minuciosos sejam necessários. É interessante salientar que a dose da dipirona utilizada neste estudo não foi diferente da dose encontrada em outros estudos, e que doses similares a nossa, não mostraram efeitos sistêmicos quando periféricamente aplicadas (CUNHA et al., 2004, ALVES & DUARTE, 2002).

Alguns estudos também demonstraram que as naftoquinonas podem possuir atividade antinociceptiva, pois algumas delas inibem a atividade do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B, *in vitro*. Song e colaboradores demonstraram que a isoeleuterina pode suprimir a expressão da NO sintetase e de várias citocinas por inibir a atividade do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (SONG et al., 2009). De maneira semelhante, Ahn e colaboradores mostraram que uma furonaftoquinona suprimiu a expressão de COX<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7 o que conferiria um potencial efeito anti-inflamatório e analgésico a este composto (AHN et al., 2005). Embora os dados apresentados para os efeitos analgésicos da Agregatina D sobre a hiperalgisia induzida por citocinas e prostaglandinas já apontassem para o fato de que este mecanismo não seria o mecanismo pelo qual este composto estaria atuando, resolvemos investigar esta hipótese avaliando *in vitro* o efeito da Agregatina D sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais. Como era esperado, o tratamento dos macrófagos com Agregatina D não modificou a produção de NO por macrófagos, particularmente após a estimulação com LPS em todas as concentrações utilizadas. É bastante difícil extrapolar as concentrações utilizadas no estudo com os macrófagos para aquelas utilizadas *in vivo*. Por esta razão utilizamos uma ampla faixa de concentrações *in vitro*. Além disso, drogas que inibem a ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B, normalmente demonstram ter além da ação antinociceptiva, propriedade anti-inflamatória e antitérmica, uma vez que os mesmo mediadores inflamatórios estão envolvidos com os mecanismos de indução de febre e estas ações não foram encontradas no extrato etanólico obtido da *S. aggregata*

(Ver Anexo 1). Todos estes dados em conjunto sugerem que a Agregatina D não é capaz de inibir a atividade do fator de transcrição nuclear  $\kappa B$ , e conseqüentemente a expressão de NO sintase de maneira similar ao que foi demonstrado para a isoeleuterina (SONG et al., 2009) e para outras naftoquinonas.

Os membros da família TRP de canais catiônicos são estruturas celulares fundamentais para a detecção de estímulos nocivos e também não nocivos, tais como estímulos físicos e químicos do ambiente, transformando esses estímulos em potenciais de ação nos neurônios somatosensoriais (STUCKY ET AL., 2009). Nos mamíferos há pelo menos 28 tipos diferentes desses canais, os quais são formados por seis domínios transmembrana e possuindo um poro entre o quinto e o sexto domínio. Desses canais, o canal TRPV<sub>1</sub> foi o primeiro a ser descoberto em mamíferos (CATERINA et al., 1997). Este canal é ativado pela substância pungente presente na pimenta vermelha, a capsaicina, por temperaturas nocivas, veneno de aranha, além de sua ativação ser facilitada por redução do pH e pela exposição aos mediadores liberados durante o processo inflamatório (PATAPOUTIAN et al., 2009). Além disso, o influxo de Ca<sup>2+</sup> induzido pela capsaicina induz a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores dos terminais periféricos (GAMSE, 1982, HOLZER, 1988). Isso torna a capsaicina uma ferramenta farmacológica amplamente usada nos estudos sobre a dor. De fato, observou-se no presente estudo que a aplicação da capsaicina na pata dos animais induziu ao comportamento nociceptivo evidenciado pelo tempo que estes permaneceram lambendo as patas injetadas. Além disso, o tratamento local dos animais com o antagonista funcional e não seletivo dos canais TRP, o corante organometálico vermelho de rutênio, inibiu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina. O tratamento local com a Agregatina D na dose analisada, não teve nenhum efeito na nocicepção induzida pela capsaicina, indicando que o composto não tem nenhum efeito na ativação desse receptor induzida por capsaicina.

O receptor TRPA<sub>1</sub> é expresso por um subconjunto de fibras do tipo C, que também expressam o receptor tirosina quinase A para o NGF e o canal TRPV<sub>1</sub>, contribuído portanto, para a excitabilidade dos nociceptores e também para a inflamação neurogênica (BAUTISTA et al., 2013). Muitas substâncias pungentes, exceto a capsaicina ativam o canal TRPA<sub>1</sub>. Tais compostos incluem irritantes exógenos que causam dor e inflamação, como alilisotiocianato, cinamaldeído e alicina (PATAPOUTIAN et al., 2009). Além disso, a ativação do canal TRPA<sub>1</sub> é



positivamente modulada pela família de receptores acoplados à proteína G, como os receptores de vários mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina, via ativação das proteínas quinases A e C (WANG et al., 2008). Os dados do presente estudo confirmam que a aplicação intraplantar do cinamaldeído nas patas dos animais promove um comportamento nociceptivo evidente, comportamento este que foi significativamente atenuado nos animais que receberam o antagonista do canal TRPA<sub>1</sub>, a cânfora. Por outro lado, observou-se que o tratamento local dos animais com a Agregatina D, na mesma dose utilizada nos outros testes, não foi capaz de alterar o comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído. Esse resultado sugere que uma possível interação com canal TRPA<sub>1</sub> não faz parte do mecanismo antinociceptivo da Agregatina D observado na hiperalgesia induzida pela carragenina, embora se saiba que ele é essencial tanto para o desenvolvimento como para a manutenção da hiperalgesia induzida por este agente (BONET et al., 2013).

Os canais catiônicos ASIC são canais insensíveis a mudanças de voltagem na membrana, com dois domínios transmembrana e uma amplo domínio extracelular e estão envolvidos na mecanotransdução sensorial em mamíferos (CHEN & WONG, 2013). O subtipo ASIC<sub>3</sub> é principalmente expresso nos neurônios sensoriais e é o canal mais sensível para detectar mudanças no pH extracelular (WALDMANN et al., 1997, SMITH et al., 2007). Esse canal é sensível a amilorida, e confirmamos no presente estudo que o tratamento local com a amilorida reverteu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração da solução salina acidificada. Entretanto, o tratamento local com a Agregatina D na dose testada, não foi capaz de impedir a ativação desse canal pela solução salina acidificada.

O receptor TRPM<sub>8</sub> tem sido descrito como um canal que é ativado pelo frio e pelo mentol, com proeminente dependência da voltagem da membrana para que seja ativado (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2007). Embora, a ativação desse receptor pelo mentol possa induzir antinocicepção em alguns modelos de dor inflamatória e visceral (LIU et al., 2013), nosso resultado demonstrou que o mentol promoveu nocicepção. Não se pode entretanto descartar a possibilidade de que a alteração comportamental induzida pelo mentol esteja relacionada com a ativação de outros receptores TRP, tais como o TRPV<sub>3</sub> e o TRPA<sub>1</sub>, uma vez que o mentol tem baixa especificidade pelo TRPM<sub>8</sub> (MACPHERSON et al., 2006, VOGT-EISELE et al., 2007). No entanto, considerando os resultados obtidos com os outros agonistas, a

ausência de um efeito antinociceptivo da Agregatina D sobre a nocicepção induzida por mentol sugere que um bloqueio direto de TRPM<sub>8</sub> também não está envolvido no efeito antinociceptivo desta naftoquinona. Porém, considerando de maneira geral que os receptores TRP estão envolvidos com as vias de sensibilização que culminam com a indução da hiperalgisia inflamatória, é possível que a Agregatina D tenha algum efeito nessas vias. Essa hipótese deve-se ao fato de que os experimentos demonstrados no presente estudo envolvendo os receptores TRPV<sub>1</sub>, TRPA<sub>1</sub> e TRPM<sub>8</sub> foram desenvolvidos com ativadores diretos desses canais, impedindo portanto uma avaliação mais minuciosa das vias que levam a sua sensibilização na hiperalgisia inflamatória. Portanto, uma ação relacionada a estes canais ainda é possível.

Considerado nossos resultados, sugerimos um importante potencial terapêutico periférico para a Agregatina D, que em comparação com as drogas comumente usadas parece ter um mecanismo de ação bastante diferenciado e com doses bastante inferiores às daquelas de outras drogas atualmente disponíveis para tratar a dor inflamatória. Também sugerimos que seu possível mecanismo de ação encontra-se antes da ativação da via da AC-AMPC-PKA nos nociceptores. Talvez ela seja um modulador da via de sinalização induzida pela ativação da proteína G, nos receptores acoplados a proteína G da bradicinina, da dopamina e da prostaglandina E<sub>2</sub>.

A ação modulatória da subunidade alfa da proteína G já foi descrita para algumas toxinas, tais como a toxina pertussis e a toxina colérica (MANGMOOL & KUROSE, 2011). E essas ações podem modular negativamente cascatas de segundos mensageiros intra celulares responsáveis por induzir a sensibilização dos neurônios periféricos nociceptivos (MANGMOOL & KUROSE, 2011).

Outra possível maneira de esclarecer o efeito antinociceptivo da Agregatina D é sua possível interação com proteínas reguladoras da proteína G (RGS, do inglês *Regulatory Proteins of G Proteins Signaling*). As RGS pertencem a uma ampla família de proteínas com distribuição tecidual única, e que fortemente modulam a atividade de GTPase da subunidade alfa da proteína G heterotrimérica (ZHONG & NEUBIG, 2000). Evidências indicam que o subtipo RGS<sub>2</sub> é capaz de exercer efeitos regulatórios na excitabilidade neuronal, ao bloquear funcionalmente a via de sinalização dependente da ativação da proteína Gq (KEHRL & SINNARAJAH, 2002).

No entanto, todas estas hipóteses, bem como outros possíveis alvos, precisam de estudos mais detalhados.

Concluindo, o composto isolado do extrato etanólico feito à partir dos bulbos de *S. aggregata*, a Agregatina D, apresentou uma importante atividade analgésica periférica, pois inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, pelas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-1, pela bradicinina e pelos representantes dos mediadores finais responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, a prostaglandina E<sub>2</sub> e a dopamina. Porém, o composto não teve nenhum efeito na hiperalgesia induzida pelo ativador da AC, a forskolina nem pelo segundo mensageiro, o dbAMPC, sugerindo que sua ação se encontre em algum ponto entre a ativação do receptor acoplado à proteína G e a ativação da AC. Além disso, com a Agregatina D não modificou a liberação de NO por macrófagos peritoneais induzida por LPS e nem teve seu efeito antinociceptivo antagonizado pelo bloqueador dos canais de potássio glibenclamida. Sugerimos que a inibição da atividade do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B, ou ativação de canais de potássio sensíveis à ATP poderiam ser descartados como possíveis modo de ação deste composto.

## REFERÊNCIAS

AHN, K. Y., KIM, B. H., et al. "Dual inhibitory effects of furonaphthoquinone compound on enzyme activity and lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in macrophages." **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, n.1, 93-99, 2005.

AKERMAN, S., KAUBE, H., GOADSBY, P.J. Anandamide Is Able to Inhibit Trigeminal Neurons Using an in Vivo Model of Trigemino-vascular-Mediated Nociception. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 1, 56-63, 2003.

ALESSANDRI-HABER N., DINA, O.A, JOSEPH, E.K, REICHLING, D.B, LEVINE, J.D. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. **Journal Neuroscience**, 28, 1046–1057, 2008.

ALLOUI, A., CHASSAING, C., SCHIMIDT, J., ARDIDI, D., DUBRAY, C., CLOAREC, A. et al. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. **Eur J Pharmacol**, 443, 71–77, 2002.

ALMEIDA, A., LIMA, D. Activation by cutaneous or visceral noxious stimulation of spinal neurons projecting to the medullary dorsal reticular nucleus in the rat: a c-fos study. **European Journal Neuroscience**, 9, 686-695, 1997.

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

ALVES, D. P., TATSUO, M.A.F., LEITE, R., DUARTE, I.D.G. Diclofenac induced peripheral antinociception is associated with ATP – sensitive K<sup>+</sup> channels activation. **Life sciences**, v. 74, 2577-2591, 2004.

ALVES, D.P., DUARTE, I.D.G. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipirone. **European Journal of Pharmacology**, 444, 47-52, 2002.

ANDERSSON, D.A., CHASE, H.W., BEVAN, S. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. **Journal Neuroscience**, 24, 5364–5369, 2004.

ANDRADE, E. L., A. P. LUIZ, Ferreira, J., CALIXTO, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, 511-520, 2008.

AOYAMA, T., KOGA, S., NAKATSUKA, T., FUJITA, T., GOTO, M., KUMAMOTO, E. Excitation of rat spinal ventral horn neurons by purinergic P2X and P2Y receptor activation. **Brain Research**, 1340, 10-17, 2010.

AULT, B., HILDEBRAND, L.M. Activation of nociceptive reflexes by peripheral kainate receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, n. 265, 927-932, 1993.

BAERUERLE, P.A., BALTIMORE, D. NF-KB: ten years after. **Cell**, 87, 13-20, 1996.

BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARCON, RODRIGO et al. Antinociception of  $\beta$ -D-glucan from *Pleurotus pulmonaris* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, 872-877, 2012.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, 91-104, 2001.

BARBER, L.A., VASKO, M.R. Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons. **J Neurochem**, 67, 72-80, 1996.

BARBOSA, F.L., MORI, L.S., RIVA, D., STEFANELLO, M.E.A., ZAMPRONIO, A.R. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and 8-Methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* Tubers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, n. 1, 1-7, 2013.

BARDONI, R. Role of presynaptic glutamate receptors in pain transmission at the spinal cord level. **Current Neuropharmacology**, v.11, n. 5, 477-483, 2013.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, 211, 39-50, 2012.

BAUTISTA, D.M., PELLEGRINO, M., TSUNOZAKI, M. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. **Annual Review of Physiology**, n. 75, 1-20, 2013.

BAUTISTA, D.M., PELLEGRINO, M., TSUNOZAKI, M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. **Annual Rev Physiol**, n.75, 1-20, 2012.

BESSION, J. M., GUILBAUD, G., OLLAT, H. Forebrain Areas Involved in Pain Processing, **John Libbey Eurotext**, Paris, 283, 1995.

BLAND-WARD, P. A. and Humphrey, P. P. A. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. **Br J Pharmac**, n. 122, 365-371, 1997.

BONET, I.J.M., FISCHER, L., PARADA, C.A., TAMBELLI, C.H. The role of transient receptor potential A1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, 65, 206-212, 2013.

BOOLELL, M.; TOOKE, J. E. The skin hyperaemic response to local injection of substance P and capsaicin in diabetes mellitus. **Diabetic Med.**, n. 7, 898-901, 1990.

BOOTING, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. **Tromb Res**, n. 110, 269-72, 2003.

BORASCHI, D., TAGLIABUE, A. The interleukin-1 receptor family. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, 394-407, 2013.

BRAIN, S. D. and Cambridge, H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. **Gen.Pharmacol.**, 27, 607-611, 1996.

BRAZ, J., SOLORZANO, C., WANG, X., BASBAUM, A. I. Transmitting pain and itch messages: A contemporary view of spinal cord circuits that generate gate control. **Neuron**, 82, 522-536, 2014.

BURGESS, G.M., MULLANEY, I., MCNEILL, M., DUNN, P.M., RANG, H.P. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. **J Neurosci**, n. 9, 3314–25, 1989.

BURNSTOCK, G. P2X receptors in sensory neurones. **British Journal of Anaesthesia**, n. 84, 476-88, 2000.

BUSHNELL, M. C. Thalamic processing of sensory-discriminative and affective-motivational dimensions of pain. In: **Forebrain Areas Involved in Pain Processing**, pp. 63±78. Eds. J-M. Besson, G. Guilbaud and H. Ollat. John Libbey Eurotext, Paris, 1995.

CALI, C., LOPATAR, J., PETRELLI, F., PUCCI, L., BEZZI, P. G-Protein Coupled Receptor-Evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes: Role of Prostaglandins. **Neural Plasticity**, 2014.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, 37-39, 2003.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, n. 87, 1-5, 2000.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kB pathways. **British Journal of Pharmacology**, n.127, 1851- 59, 1999.

CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, n. 389, 816–824, 1997.

CERVERO, F. Sensory innervation of the viscera peripheral basis of visceral pain. **Physiol. Rev.**, n. 74, 95-138, 1994.

CESARE, P. & MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 93, 15435-15439, 1996.

CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI, H., ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 99, 13926-31, 2002.

CHAPLAN, S.R., BACH, F.W., POGREL, J.W., CHUNG, J.M., YAKSH. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, 53, 55-63, 1994.

CHAPMAN, C.R., GRAVIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, n. 353, 2233-37, 1999.

CHEN, C.C., AKOPIAN, A.N., SIVILOTTI, L., COLQUHOUN, D., BURNSTOCK, G., WOOD, J.N., A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. **Nature**, n. 377, 428-31, 1995.

CHENG, C.C., WONG, C.W. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. **J Cell Mol Med** , v.17, n. 3, 337-49, 2013.

CHU, Y.C., GUAN, Y., SKINNER, J., RAJA, S.N., JOHNS, R.A., TAO, Y.X. Effect of genetic knockout or inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complet Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**, n. 119, 113-123, 2005.

COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J.C, LE BARS , D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, n. 72 , 359–371, 2005.

COUTURE, R., HARRISSON, M., VIANNA, R.M., CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, 429, 161–176, 2001.

CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, v.104, n. 3, 765-67, 1991.

CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M., TEIXEIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, n.127, 671-678, 1999.

CUNHA, T.M, VERRI, W.A Jr, FUKADA ,S.Y, GUERRERO, A.T, SANTODOMINGO-GARZÓN, T., POOLE, S., PARADA, C.A, FERREIRA, S.H, CUNHA, F.Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur J Pharmacol** , n. 573, 221–29, 2007.

CUNHA, T.M., CAMPOS, D.R., LOTUFO, C. M., DUARTE, H.L., SOUZA, G. R., VERRI, W.A., FUNEZ Jr, M.I., DIAS, Q.M., SCHIVO, I.R., DOMINGUES, A.C., SACHS D., CHIAVEGATTO, S., TEIXEIRA, M.M., HOTHERSALL, J.S., CRUZ, J.S., CUNHA, F.Q. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3KY/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107, 4442-47, 2010.

CUNHA, T.M., VERRI, W.A. Jr, VIVANCOS, G.G., MOREIRA, I.F., REIS, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, 2004.

CUNHA, T.M., VERRI, W.A., Jr. SILVA, J.S., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERRERIA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice, **The National Academy of Sicences of the USA**, 102, 1755-60, 2005.

CURY, Y., PICOLO, G., GUTIERREZ, V.P., FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, n. 25, 243-54, 2011.

DAVATELIS, G., WOLPE, S.D., SHERRY, B., DAYER, J.M., CHICHEPORTICHE, R., CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin independent endogenous pyrogen. **Science**, 243, 1066-68, 1989.

DE ALBA, J., CLAYTON, N.M., COLLINS, S.D., COLTHUP, P., CHESSELL, I., KNOWLES, R.G. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible

isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rats models of inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, n. 120, 170-81, 2006.

DÉCIGA-CAMPOS, M., LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Participacion of the l-arginine-nitric oxide cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxibe. **Eur. J. Pharmacol**, 484, 193-99, 2004.

DELEO, J.A., TANGA, F.Y., TAWFIK, V.L. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. **Neuroscientist**, n.10, 40-52, 2004.

DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurons in the rat. **Brain Res**, n. 506, 31-39, 1990.

DINA, O.A., HUCHO, T., YEH, J., MALIK-HALL, M., REICHLING, D.B., LEVINE, J.D. Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia. **Pain**, n. 115, 191-203, 2005.

DINARELLO, C.A. A clinical perspective of IL-1b as the gatekeeper of inflammation. **Eur J Immunol**, n. 41, 1203–1217, 2011.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory Cytokines. **Chest Journal**, v.118, n. 2, 503-508, 2000.

DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, 20, 441-462, 1980.

DIXON, W.J. Staircase bioassay: the up-and down method. **Neurosci Biobehav Rev**, n.15, 47-50, 1991.

D'MELLO, R., DICKENSON, H. Spinal cords of mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n.1, 8-16, 2008.

DONNERER, J.; AMANN, R. The inhibition of neurogenic inflammation. **Gen Pharmac**, n. 24, 519-529, 1993.

DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur J Pharmacol**, n.186, 289-93, 1990.

DUARTE, I.D.G., SANTOS, I.R., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, n. 217, 225 -27, 1992.

DUBIN, A., PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.11, 3760-3772, 2010.

EDVINSSON, L., CANTERA, L., JANSEN-OLENSEN, I., Uddman, R. Expression of calcitonin gene related peptide 1 receptor mRNA in human trigeminal ganglion and cerebral arteries. **Neuroscience Lett**, 229, 209-211, 1997.



FABBRETTI, E., ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. **Cellular Neuroscience**, v. 7, 1-6, 2013.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, n.46, 1-9, 1993b.

FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **Brazilian Journal of Pharmacology**, 110, 1227-1231, 1993.

FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O.H., ANDERSEN, P.S., GIRARDIN, S.E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. Clinical and Experimental Immunology. **British Society for Immunology**, n. 147, 227-235, 2006.

FIELDS, H. L. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 32, n.3, 242-246, 2007.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, n. 294, 1871-1875, 2001.

FUSARO, M.C.G. O., PELEGRINI-DA-SILVA, A., ARALDI, D., PARADA, C.A., TAMBELI, C.H. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE2 or dopamine. **European Journal of Pharmacology**, n. 649, 177-182, 2010.

GABAY, C., LAMACCHIA, C., PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews**, v.6, 232-41, 2010.

GAMMON, C.M., ALLEN, A.C., MORELL, P. Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. **J Neurochem**, n. 53, 95-101, 1989.

GOLD, M.S. & GEBHART, G. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, n. 11, 1248-57, 2010.

GOMES, M. A. N., SHEPHERD, S. L. K., Estudo de nutrição mineral in vitro relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, n. 23 , v.2 , 153-59, 2000.

GOUDET, C., MAGHNAGHI, V., LANDRY, M., NAGY,F., GEREAU IV, R,W., PIN, J,P. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Research Reviews**, 60, 43-56, 2009.

GRAHAM, D.J., CAMPEN, D., HUI, R., SPENCE, M., CHEETHAM, C., LEVY, G., SHOOR, S., RAY, W.A. Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study. **Lancet**, n. 365, 475-81, 2005.

GRANT, A.D., COTTRELL, G.S., AMADESI,S.,TREVISANI, M., NICOLETTI, P., MATERAZZI, S., ALTIER,C., CENAC,N. et al. G.W. Protease-activated receptor 2

sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia. **J Physiol**, n. 578, 715-33, 2007.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 126,131-38, 1982.

GÜHRING, H., HAMZA, M., SERGEJEVA, M., ATES, M., KOTALLA, C.E., LEDENT, C., BRUNE, K. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. **Eur J Pharmacol**, 454,153–63, 2002.

GUTOWSKI, S., SMRCKA, A., NOWAK, L., WU, D.G, SIMON, M., STERNWEIS, P.C. Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. **J Biol Chem**, n. 266: 20519–24, 1991.

GUZIK, T.J., KORBUT, R., ADAMEK-GUZIK, A. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, n. 54, v. 4, 469-87, 2003.

HAMZA, M., DIONNE, R. Mechanisms of Non-Opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. **Curr Mol Pharmacol**, n. 2, 1-14, 2009.

HARIZI, H., GUALDE, N. The impact of eicosanoids on the cross talk between innate and adaptive immunity: the key role of dendritic cells. **Tissue Antigens**, n. 65, 507–14, 2005.

HARIZI, H., CORCUFF, J.B., GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, N.10, 461-69, 2008.

HE, X., SCHEPELMANN, K., SCHAIBLE, H. G., SCHMIDT, R. F. Capsaicin inhibits responses of fine afferents from the knee of the cat to mechanical and chemical stimuli. **Brain Res**, n. 530, 147-50, 1990.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, n. 24, 739-68, 1988.

JAFFE, J.H., JAFFE, A.B. Neurobiology of opioids In: Galanter, M.; Kleber, H.D., editors. **Textbook of Substance Abuse Treatment**. Washington, D.C.: American Psychiatric Publishing, 17-30, 2004.

JÄNIG, W., LEVINE, J.D., MICHAELIS, M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. **Prog Brain Res**, n. 113, 161-84, 1996.

JI, R.R, SAMAD, T.A, JIN, S.X, SCHMOLL, R., WOOLF, C.J. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, n. 36, 57-68, 2002.

JIN, X., GEREAU, R.W. Acute p38-Mediated Modulation of Tetrodotoxin-Resistant sodium Channels in Mouse Sensory Neurons by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . **The Journal of Neuroscience**, n. 26, 246-55, 2006.

JULIUS, D., BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, 203- 10, 2001.

KAWABATA, A. **Bioll Pharm Bull**, v. 34, n.8, 1170-73, 2011.

KEHRL, J.H., SINNARAJAH, S. RGS2: a multifunctional regulator of G protein signaling. **Int J Biochem Cell Biol**, n.34, v.5, 432-38, 2002.

KENDALL, N.A., Psychological approaches to the prevention of chronic pain: the low back paradigm. **Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol**, n. 13, 545-54, 1999.

KHAKH, B. S. & NORTH, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. **Nature**, 442, 527-532, 2006.

KHASAR, S.G., MIAO, J.P., JANIG, W., LEVINE, J.D., Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents. **European Journal of Neuroscience**, 10, 435-44, 1998.

KHASAR, S.G. MCCARTER, G. , LEVINE, J.D. Epinephrine produces a b-Adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and In Vitro sensitization of rat nociceptors. **The American Physiological Society**, 1104-12, 1999.

KRUGER, L. Morphological features of thin sensory afferent fibers: a new interpretation of 'nociceptor' function. **Prog. Brain Res.**, n. 74, 253-57, 1988.

KUBY, J. Immunology. W.H. **Freeman and Company**. 3a ed., 1997.

KUMAZAWA, T., MIZUMURA, K., KODA, H., FUKUSAKO, H. EP receptor subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. **J Neurophysiol**, n. 75, 2361-68, 1996.

LÁZARO-IBÁÑEZ, G.G., TORRES-LÓPEZ, J.E., GRANADOS-SOTO, V. Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociceptive action of Ketorolac. **Eur J Pharmacol.**, 426, 39-44, 2001.

LEÁNEZ, S., ARNAU, H., POL, O. Peripheral antinociceptive effects of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**, n. 602, 41-49, 2009.

LEVINE, J.D., ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1772, 989-1003, 2007.

LEVINE, J.D., FIELDS, H.L., BASBAUM, A.I. Peptides and the Primary Afferent Nociceptor. **The Journal of Neuroscience**, v.13, n. 6, 2279-86, 1993.

LEVINSON, S.R., LUO, S., HENRY, M.A. The role of sodium channels in chronic pain. **Muscle Nerve**, N.46, 155-65, 2012.

LIGHT, A. R. **The Initial Processing of Pain and its Descending Control: Spinal and Trigeminal Systems** (ed. Reichmann, H.) (S. Karger AG, Basel, 1992).

LINLEY, J.E., ROSE, K., OOI, L., GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, n. 459, 657-69, 2010.

LIU, B., FANA, L., BALAKRISHNA, S., SUIA, A., MORRIS, J.B., JORDT, S.E. TRPM8 is the Principal Mediator of Menthol-induced Analgesia of Acute and Inflammatory Pain. **Pain**, n. 10, 2169-77, 2013.

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

LONE, A.M., TASKÉN, K. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 130, 1-14, 2013.

LONG, S.K., SMITH, D.A., SIAREY, R.J., EVANS, R.H. Effect of 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline (CNQX) on dorsal root, NMDA, Kainate and quisqualate-mediated depolarization of rat motoneurons in vitro. **British Journal of Pharmacology**, n. 100, 850-54, 1990.

LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dypirone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, n. 114, 375-381, 1985.

LORENZETTI, B.B., VEIGA, F.H., CANETTI, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **European Cytokine Network**, v. 13, n. 4, 456-461, 2002.

LOYD, D.R., HENRY, M.A., HARGREAVES, K.M. Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, n. 1, 51-57, 2013.

LU, Y., YANG, J.H., LI, X., HWANGBO, K., HWANG, S.L., TAKETOMI, Y., MURAKAMI, M., CHANG, M.Y., KIM, C.H., SON, J.K., CHANG, H.W. Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n.11, p. 1700-08, 2011.

LUO, P., WONG, Y.F., GE, L., ZHANG, Z.F., LIU, Y., LIU, L., ZHOU, H. Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Plumbagin through Inhibition of Nuclear Factor-kappa B Activation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n.3, 735-74, 2010.

MACPHERSON, L.J., XIAO, B., KWAN, K.Y., PETRUS, M.J., DUBIN, A.E. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **J Neurosci**, n. 27, 11412-415, 2007.

MACPHERSON, L.J., HWANG, S.W., MIYAMOTO, T., DUBIN, A.E., PATAPOUTIAN, A., STORY, G.M. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci*, n. 32, 335-43, 2006.

MAGGI, C. A. Capsaicin and primary afferent neurons: from basic science to human therapy?. *J. Auton. Nerv. Syst*, n. 33, 1-14, 1991a.

MAGGI, C.A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmac*, n11, 173-208, 1991b.

MAGGI, C.A. & SCHAWARTZ, T.W. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacology Science*, n. 18, 351-355, 1997.

MANDADI, S., TOMINAGA, T., NUMAZAKI, M., MURAYAMA, N., SAITO, N., et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCe-mediated phosphorylation at S800. *Pain*, n. 123, 106-16, 2006.

MANGMOOL, S., KUROSE, H. Gi/0 Protein-Dependent and Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins*, 3, 884-99, 2011.

MANTYH, P. W., CATTON, M. D., BOEHMER, C. G., WELTON, M. L., PASSARO, E. P., MAGGIO, J. E. and VIGNA, S. R. Receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory diseases: implications for the effector role of sensory neurons. *Peptides*, n. 10, 627-45, 1989.

MANTYH, P.W., ROGERS, S.D., HONORE, P., ALLEN, B.J., GHILARDI, J.R., LI, J., DAUGHTERS, R.S., LAPPI, D.A., WILEY, R.G. & SIMONE, D.A. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons-expressing the substance P receptor. *Science*, 278, 275-279, 1997.

MCCMAHON, S.B., BENNET, D.L.H., BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators. In: **Koltzenburg M., McMahon SB (eds), Wall and Melzack's textbook of pain**. Elsevier, Edinburgh, 49-72, 2006.

MEVES, H. The Action of Prostaglandins on Ion Channels. *Current Neuropharmacology*, , n. 4, 41-57, 2006.

MEYER, R.A., MATTHIAS, R., CAMPBELL, J.N. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: **Wall PD, Melzack R., editors. Textbook of pain**. 5 a. Ed. Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone, 2006, 3-34.

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

MILLAN, M.J. The induction of Pain: an Integrative Review. *Progress in Neurobiology*, 57, 1-164, 1999.

MITCHELL, J.A., LARKIN, S., WILLIAMS, T.J. COX2 regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol*, n. 50, 1535-42, 1995.

MIZUMURA, K., KUMAZAWA, T. Modification of nociceptor responses by inflammatory mediators and second messengers implicated in their action- a study in

canine testicular polymodal receptors. In: **Kumazawa T, Kruger L, Mizumura K (eds) The polymodal receptor—a gateway to pathological pain.** Elsevier, Amsterdam, 115–41, 1996.

MIZUMURA, K., SUGIURA, T., KATANOSAKA, K., BANIK, R.K., KOZAKI, Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp Brain Res*, n. 196, 53-65, 2009.

MOMIN, A., MCNAUGHTON, P.A. Regulation of Wring frequency in nociceptive neurons by pro-inflammatory mediators. *Exp Brain Res*, n. 196, 45–52, 2009.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, patophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-142, 1991.

MORETAS, M.P., BUCHI, D.F., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M., OLIVIERA, M.B.M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, n. 89, 175-85, 2003.

MORI, L.S., BOLLER, S., KASSUYA, C.A.L., STEFANELLO, M.E.A., ZAMPONIO, A.R. Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopin, a semi-synthetic analogue of xylopin. *Phytomedicine*, n. 18, 143–47, 2011.

MORRIS, R. Responses of spinal dorsal horn neurons evoked by myelinated primary afferent stimulation are blocked by excitatory amino acid antagonists acting at kainite/quisqualate receptors. *Neuroscience Letters*, n. 105, 79-85, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal Immunology Methods*, n. 65, 55–63, 1983.

MUKHERJEE, D., NISSEN, S.E., TOPOL, E.J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, n. 286, 954-59, 2001.

MUÑOZ, M., COVEÑAS, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids*, 46, 1727-50, 2014.

NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor Knockout mice. *J Mol Med*, n. 87, 1015-22, 2009.

NIELSEN, O.H., AINSWORTH, M., CSILLAG, C., RASK-MADSEN, J. Systematic review: coxibs non-steroidal anti-inflammatory drugs or no cyclooxygenase inhibitors in gastroenterological high-risk patients? *Alimentary Pharmacology e Therapeutics*, 23, 27-33, 2006.

NOGUERA, B., CAMACHO, M.D.R., MATA, R. *Fitoterapia*, v. 65, n.182, 1994.

OH, U., HWANG, S. W., KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, n. 16, 1659-667, 1996.

OMOTE, K., HAZAMA, K., KAWAMATA, T., KAWAMATA, M., NAKAYAKA, Y., TORIYABE, M., NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res**, n. 912, 171-75, 2001.

ONODERA, K., H. SHINODA, ZUSHIDA, K., TAKI, K., KAMEI, J. Antinociceptive effect induced by intraperitoneal administration of vitamin K2 (menatetrenone) in ICR mice. **Life Science**, v. 68, n.1, 91-97, 2000.

ORTIZ, M.I., GRANADOS-SOTO, V., CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G. The NO-cGMP-K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. **Pharmacol Biochem Behav**, 76, 187-95, 2003.

OSSIPOV, M.H., DUSSOR, G.O., PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, V. 120, n. 11, 3779- 787, 2010.

OTUKI, M. F., J. FERREIRA, LIMA, F.V., MEYRE-SILVA, C., MALHEIROS, A., MULLER, L.A., CANI, G.S., SANTOS, A.R., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, 313 (1), 310-18, 2005.

PATAPOUTIAN, A., TATE, S., WOOLF, C. J. Transient Receptor Potential Channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews**, v. 8, 55-68, 2009.

PATERSON, K.J., ZAMBREANU, L., BENNETT, D.L.H., MCMAHON, S.B. Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. **Pain**, 154, 6, 782–92, 2013.

PETHO, G., DEROW, A., REEH, P.W. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. **European Journal of Neuroscience**. 14, 210–18, 2001.

PETHŐ, G., REEH, P.W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiol Rev**, n. 92, 1699–1775, 2012.

PINARDI, G., SIERRALTA, F., MIRANDA, H.F. Adrenergic mechanisms in antinociceptive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in acute thermal nociception in mice. **Inflamm Res**, 51, 219–222, 2002.

PIPER, A.S, YEATS, J.C, BEVAN, S., DOCHERTY, R.J A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. **J Physiol**, n. 518, 721-33, 1999.

PRADO, F.C, ARALDI, D., VIEIRA, A.S., OLIVEIRA-FUSARO, M.C.G., TAMBELI, C.H., PARADA, C. A. Neuronal P2X3 receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. **Neuropharmacology**, n. 67, 252-58, 2013.

PREMKUMAR, L.S, AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, n. 408, 985–90, 2000.

QIN, H.Y., LUO, J.L., QI, S., XU, H.X., SUNG, J.J.Y., BIAN, Z.X. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. **European Journal of Pharmacology**, 647, 75-83, 2010.

RAJA, S. N. Peripheral modulatory effects of catecholamines in inflammatory and neuropathic pain. **Adv. Pharmacol**, n. 42, 567–71, 1998.

REXED B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **J Comp Neurol**, n. 96, 414–495, 1952.

REZENDE, R.M., FRANÇA, D.S., MENEZES, G.B., REIS, W.G.P., BAKHLE, Y.L., FRANCISCHI, J.N. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**, n. 153, 760–68, 2008.

RIVA, R., BARISON, A., STEFANELLO, M.E.A., POLIQUESI, C.B. A., RUIZ, L.T.G., CARVALHO, J.E., SALVADOR, M.J. Chemical study of *Sinningia allagophylla* guided by antiproliferative activity assays. **Química Nova**, v. 35, n. 5, 974, 2012.

ROGOSCH, T., SINNING, C., PODLEWSKI, A., WATZER, B., SCHLOSBERG, J., LICHTMAN, A.H., CASCIO, M.G., BISOGNO, T., DI MARZO, V., NÜSING, R., IMMING, P. Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n. 20 101–107, 2012.

ROMERO, T.R.L., RESENDE, L.C., DUARTE, I.D.G. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanisms induced by several analgesic drugs. **Nitric Oxid**, 25, 431-435, 2011.

ROSA, A.C., FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, n. 170, 38-45, 2013.

ROSENBLUM, A., MARSCH, L.A., JOSEPH, H., PORTENOY, R.K. Opioids and Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. **Exp Clin Psychopharmacol**, n. 16, 405-16, 2008.

SACHS, D., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine\_NO\_cGMP\_protein kinase G\_ATP-sensitive K\_channel pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n.10, 3680-85, 2004.

SAMSAM, M., COVEÑAS, R., AHANGARI, R., YAJEYA, J., NARVÁEZ, J.A., TRAMU, G. Simultaneous depletion of neurokinin A, substance P and calcitonin gene-related peptide from the caudal trigeminal nucleus of the rat during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. **Pain**, v. 84, 389-95, 2000.

SANDRINI, M., VITALE, G., PINI, L.A. Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. **Inflamm Res**, 51, 154–59, 2002.

SANO, H., HLA, T., MAIER, J.A.M., CROFFORD, L.J., CASE, J.P., MARIAG, T., WILDER, R.L. In vivo cox expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. **J Clin Invest**, n. 89, 97-108, 1992.



SANSUM, A. J., CHESSELL, I. P. AND HUMPHREY, P. P. A. Characterisation of purinoceptors mediating responses to ATP on rat dorsal roots. **Br J Pharmac**, n. 120, p.128, 1997.

SANTOS, G.G., DIAS, E.V., TEIXEIRA, J.M., ATHIE, M.C.P. et al. The analgesic effect of dipyron in peripheral tissues involves two different mechanisms: Neuronal K<sub>ATP</sub> channel opening and CB<sub>1</sub> receptor activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, 124-131, 2014.

SCHAIBLE, H.G., EBERSBERGER, A. , NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research & Therapy**, 2011, n. 13, v. 210, 2011.

SCHAIBLE, H.G., RICHTER, F. **Pathophysiology of Pain**. Langenbecks Arch Surg, n. 389, 237-43, 2004.

SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin e<sub>2</sub>. **Journal of Physiology**, n. 403, 91-104 , 1988.

SCHMIDTKO, A., TEGEDER, I., GEISLINGER, G. No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. **Trends in Neuroscience**, v. 32, n.6, 339-46, 2009.

SCHOLZ, J., WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature**, v. 5, 1062-67, 2002.

SEIBERT, K., ZHANG, Y., LEAHY, K., HAUSER, S., MASFERRER, J., PERKINS, W., LEE, L., ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 inflammation and pain. **Proc Natl Acad Sci**, n. 91, 12013-17, 1994.

SHIN, J., CHO ,H., HWANG, S.W, JUNG, J., SHIN, C.Y, LEE ,S.Y, KIM, S.H, LEE, M.G, CHOI ,Y.H, KIM, J., HABER, N.A, REICHLING DB, KHASAR S, LEVINE J.D, Oh U. Bradykinin-12 lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 99, 10150-55, 2002.

SIEBEL, J.S., BEIRITH,A., CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyron in mice. **Brain Research**, n.1003 , 61– 67, 2004.

SIMÕES, C.M.O.S., E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Ed. UFSC/UFRGR, 2007.

SMITH, E.S, CADIOU, H., MCNAUGHTON, P.A. Arachidonic acid potentiates acid sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. **Neuroscience** ,n. 145, 686-98, 2007.

SMITH, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochem J**, n. 259, 315–24, 1989.

SMITH, W.L., DEWITT, D.L., GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, n.69, 145–82, 2000.

SMITH, W.L., URADE, Y., JAKOBSSON, P. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev*, 111, 5821–65, 2011.

SNIDER, W.D. & MCMAHON, S. Tackling Pain at the Source New Ideas about Nociceptors. *Neuron*, v.20, 629-32, 1998.

SONG, S-H., MIN, H-Y., HAN, A-R., NAM, J-W., SEO, E-K., PARK, S.W., LEE, S.H., LEE, S.K. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- $\kappa$ B activity. *International Immunopharmacology*, n. 9, 298–302, 2009.

SOUTHALL, M.D., VASKO, M.R. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4 induced cAMP production and Sensitization of Sensory Neurons. *J. Biol. Chem*, n. 276, 16083-91, 2001.

ST- JACQUES, MA, W. Prostaglandin E2/EP4 signalling facilitates EP4 receptor externalization in primary sensory neurons un vitro and in vivo. *Pain*, n. 154, 313-23, 2013.

STEFANELLO, M. CERVI A., WISNIEWSKY Jr A. Oleo essencial de *Sinningia aggregata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 331-333, 2005.

STERANKA, L.R., MANNING, D.C., DEHAAS, C.J., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., CONNOR, J.R., VAVREK, R.J., STEWART, J.M., SNYDER, S.H., . Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 3245–249, 1988.

STUCKY, C.L. , DUBIN, A.E., JESKE, N.A., , MALIN, S.A., MCKEMY, D.D., STORY, G.M. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Research Reviews*, n.60 , 2 – 23, 2009.

STYLIANOU, E, SAKLATVALA, J. Interleukin-1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, n. 30, 1075-79, 1998.

SUTHERLAND, S.P, BENSON, C.J, ADELMAN ,J.P et al. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, n. 98, 711–16, 2001.

TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M. TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2. *Journal of immunological methods*, n. 93, 157-65, 1986.

TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia. *Brain Res*, 458, 402–406, 1988.

TAK, P.P. & FIRESTEIN, G.S. NF-KB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, v.107, n. 1, 2001.

TAYLOR-CLARK, T.E., UNDEM, B.J., MACGLASHAN, D.W., GHATTA, S., CARR, M.J., et al. Prostaglandin-Induced Activation of Nociceptive Neurons via Direct Interaction with Transient Receptor Potential A1 (TRPA1 ). **Mol Pharm**, n. 73, 274–281, 2008.

THAYER, S.A., PERNEY, T.M., MILLER, R.J. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. **J Neurosci**, n. 8, 4089–97, 1988.

THELEN, M., PEVERI, P., KERNEN, P., VON TSCHARNER, V., WALZ, A., BAGGIOLINI, M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. **FJ Research Communications**, v. 2 , n. 11, 2702-6, 1988.

TORIYABE, M., OMOTE, K., KAWABATA, T., NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, n. 101, 983-990, 2004.

TRAPERO, I., CAULI, O. Interleukin 6 and cognitive dysfunction. **Metabolic Brain Disease**, 2014.

ÜÇEYLER, N., SCHRIFERS, M., SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. **Exp Brain Res**, n. 196, 67-78, 2009.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of Pain. **Med Clin N Am**, n. 91, 1-12, 2007.

VANDIVIER, R.W, EIDSATH, A., BANKS,S.M., PREAS II, H.L ., LEIGHTON, S.B., GODIN, P.J., SUFFREDINI, A.F., DANNER,R.L. Down-Regulation of Nitric Oxide Production by Ibuprofen in Human Volunteers. **J Pharmacol Exp Ther**, 289, 1398–1403, 1999.

VANE, J.R. & BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand J Rheumatol Suppl**, 102, 9-21, 1996.

VANEGAS, H., TORTORICI, V . Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. **Cell Mol Neurobiol**, n. 22, 655–61, 2002.

VERDAN, M.H., BARISON, A., DE SA EL, SALVADOR, M.J., POLIQUESI, C.B., EBERLIN, M.N., STEFANELLO, M.E.A. Lactones and quinines from the tubers of *Sinningia aggregata*. **Journal of Natural Products**, 73, 1434-1437, 2010.

VERDAN, M.H., STEFANELLO, M.E.A. Secondary Metabolites and Biological Properties of Gesneriaceae Species. **Chemistry & Biodiversity** , v. 9 , 2701- 2731, 2012.

VERRI, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, n.112, 116-38, 2006.

VILLARREAL, C.F., SACHS, D., FUNEZ M.I., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Nav 1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochemical Pharmacology**, 77, 867-77, 2009.

VISHWANATH, R., MUKHERJEE, R. Substance P promotes lymphocyte–endothelial cell adhesion preferentially via LFA-1/ICAM-1 interactions. **Journal of Neumimmunology**, n. 71 163-71, 1996.

VOGT-EISELE, A.K., WEBER ,K., SHERKHELI ,M.A., VIELHABER ,G., PANTEN, J., Gisselmann, G., Hatt ,H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. **Br J Pharmacol** n.151, 530-40, 2007.

WADA, M., DELONG, C.J., HONG, Y.H., RIEKE,C.J., SONG, I., SIDHU, R.S.,YUAN, C., WARNOCK, M., SCHMAIER, A.H., YOKOYAMA, C.,SMYTH, E.M., WILSON, S.J., FITZGERALD, G.A., GARAVITO, R.M., SUI,D.X., REGAN, J.W., SMITH, W.L. Enzymes and Receptors of Prostaglandin Pathways with Arachidonic Acid-derived Versus Eicosapentaenoic Acid-derived Substrates and Products. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 31, 22254-266, 2007

WALDMANN, R., CHAMPIGNY, G., BASSILANA ,F., HEURTEAUX, C., LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature**, n. 386, 173-77,1997.

WANG, W.Z, CHU, X.P, LI, M.H et al. Modulation of acid sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca<sup>2+</sup>, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH. **J Biol Chem**, n. 281, 29369–378, 2006.

WANG. S., DAI,Y., FUKUOKA, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., OBATA, K., CUI, X., TOMINAGA, M., NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein Kinase A mediate Bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, n. 131, 1241-51, 2008.

WARE, C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. **Annu Rev Immunol**, n. 23, 787–819, 2005.

WILLINGALE, H.L., GARDINER, N. MCLYMONT, GILBERT, S., GRUBB, B.D. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. **British Journal of Pharmacology**, 122, 1593-1604, 1997.

WILLIS, W. D. & WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol**, n. 14, 2–31, 1997.

WOOLF, C.J., SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, n. 288, 1765-69, 2000.

WOSNIAK, K.M., ROJAS, C., WU, Y., SLUSHER, B.S. The Role of Glutamate signaling in Pain Processes and its Regulation by GCP II Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, n. 19, 1323-34, 2012.

WU, H. Assembly of post-receptor signaling complexes for the tumor necrosis factor receptor superfamily. **Adv Protein Chem**, n. 68, 225-79, 2004.

XU, Y., ZHANG, L., SHAO, T., RUAN, L., WANG,L., SUN, J., LI, J., ZHU, X.,O'DONNELL,J.M., PAn, J. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates

depression-like behaviors in reserpine-treated mice behavioral and neurobiological analyses. **Metab Brain Dis**, n. 28, 571-83, 2013.

YI, J., ZHENG, J.Y., ZHANG, W., WANG, S., YANG, Z., DOU, K. Decreased pain threshold and enhanced synaptic transmission in the anterior cingulate cortex of experimental hypothyroidism mice. **Molecular Pain**, n. 10, v. 38, 1-8, 2014.

YOSHIDA, A., MOBARAKEH, J.I., SAKURAI, E., SAKURADA, S. et al. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: A study in histidine decarboxylase gene knockout mice. **Journal of Pharmacology**, 522, 55-62, 2005.

YUAN, F.L., CHEN, F.H., LU, W.G., LI, X. Acid-sensing ion channels 3: a potential therapeutic target for pain treatment in arthritis. **Mol Biol Rep**, n. 37, 3233-38, 2010.

ZAMPRONIO, A.R., MELO, M.C., SILVA, C.A., PELÁ, I.R., HOPKINS, S.J., SOUZA, G.E. A pre-formed Pyrogenic Factor Released by Lipopolissacharide Stimulated Macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 3, n. 5, 365-73, 1994.

ZATERKA, S. Induced lesions by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Revista Brasileira de Medicina**, 57, 882-886, 2000.

ZEILHOFER, H.U., WILDNER, H., YÉVENES, G.E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. **Physiol Rev**, n. 92, 193-235, 2012.

ZEILHOFER, Z.H. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, n. 154, 73-100, 2005.

ZELOVA, H., HOSEK, J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm. Res.**, v. 62, n. 7, 641-651, 2013.

ZHANG, X., LI, L., MCNAUGHTON, P.A. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. **Neuron**, n. 59, 450-61, 2008.

ZHANG, D.X., CARLTON, S.M., SORKIN, L.S., WILLIS, W.D. Collaterals of primate spinothalamic tract neurons to the periaqueductal gray. **J. Comp. Neurol.**, n. 296, 277-290, 1990.

ZHONG, H., NEUBIG, R.R. Regulator of G Protein Signaling Proteins: Novel Multifunctional Drug Targets. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 3, 837-45, 2000.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16, 109-10, 1983.

**ANEXO**

## **ANEXO A - Antinociceptive activity of the ethanolic extract, fractions and the isolated compound aggregatin D from *Sinningia aggregata* tubers**

Geórgia Vanessa Souza<sup>1</sup>, Simas<sup>1a</sup>, A.S., Bastos-Pereira, A.L.<sup>1</sup>, Frois, G.R.A.<sup>1</sup>, Ribas, J.L.<sup>1</sup>, Verdán, M.H.<sup>2</sup>, Kassuya, C.A.L.<sup>1b</sup>, Stefanello, M.E.<sup>2</sup>, Zampronio, A.R.\*  
<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, PO Box 19031, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.  
<sup>2</sup>Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Centro Politécnico, PO Box 19081, 81530-900, Curitiba, PR, Brazil.

### **ABSTRACT**

This study investigated the antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract (ESa), fractions and isolated compounds from tubers of *Sinningia aggregata*. Male Swiss mice were treated by oral route with ESa, fractions, isolated compounds or the respective vehicles and carrageenan-induced paw oedema, neutrophil migration and mechanical hyperalgesia, formalin-induced nociception and lipopolysaccharide -induced fever were used to evaluate these activities. ESa did not change carrageenan-induced oedema and neutrophil migration or lipopolysaccharide-induced fever at any of the doses tested. In contrast, ESa, petroleum ether (PE) or ethyl acetate (EtOAc) fractions, but not dichloromethane (DCM) fraction, reduced the phase II of formalin-induced nociception. ESa also reduced dose-dependently the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Isolated compound aggregatin D (AgD, obtained from EtOAc fraction) reduced formalin-induced nociception while anthraquinones 2-methylantraquinone and 7-methoxy-2-methylantraquinone (obtained from PE fraction) were ineffective. AgD also inhibited Carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Both ESa and AgD did not change thermal nociception or motor performance of the animals. Local ipsilateral, but not contralateral, administration of AgD reduced carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner. AgD administered directly in

---

<sup>a</sup> *In memorium*

<sup>b</sup> **Present address:** Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, PO Box 533, 79804-970, Dourados, MS, Brazil.

\* **Corresponding Author** - Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, Departamento de Farmacologia, Centro Politécnico, Caixa Postal 19031, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil. E-mail: [aleksander@ufpr.br](mailto:aleksander@ufpr.br)  
Phone: +55 41 3361-1540 Fax: +55 41 3266-2042

the paw reversed dose-dependently the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan and also the mechanical hyperalgesia induced by bradykinin (BK), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and Dopamine but not that induced by forskolin or dibutyryl cAMP (dbcAMP). In a different way, the positive control dipyrone reduced the mechanical hyperalgesia induced by all stimuli. In addition, glibenclamide abolished the analgesic effect of Dip but not that induced by AgD. AgD did not change lipopolysaccharide-induced NO production by macrophages or the nociceptive behavior induced by capsaicin, cinnamaldehyde, acidified saline and menthol. These results suggest that ESa has an important antinociceptive activity related to the reduction of the hyperalgesia and AgD share similar activity by blocking the overt nociception induced by formalin and the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Also, AgD seems to exert a direct effect on nociceptive terminal, different from classical non-steroidal antiinflammatory drugs and dipyrone.

**Keywords:** *Sinningia aggregata*; Gesneriaceae; Nociception; Naphtoquinone; aggregatin D.

## 1 INTRODUCTION

Pain is one of the most pervasive problems in our society and has high social and economic impact (Julius and Basbaum 2001). One of the most outstanding characteristic of inflammatory pain is the sensitization of nociceptors (hyperalgesia) in such a way that previously slight or ineffective stimulation becomes painful (Julius and Basbaum 2001; Verri, Cunha et al. 2006). In mice, the hyperalgesia induced by an inflammatory stimulus such as carrageenan begins with the release of cytokines for instance tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and keratinocyte-derived chemokine that stimulate the release of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Cunha, Verri et al. 2005). Similarly to what happens in rats, the final nociceptive mediators are prostaglandins and sympathetic amines (Cunha, Verri et al. 2005). Other inflammatory mediators can also evoke nociception such as bradykinin (BK) (Cunha, Verri et al. 2007) and substance P (SP) (Denadai-Souza, Camargo Lde et al. 2009). BK can indirectly



induce sensitization of peripheral neurons and activate ion channels, such as the transient receptor potential vanilloid (TRPV<sub>1</sub>) (Petho and Reeh 2012).

Besides pain, oedema formation is also observed during the inflammatory response and similar mediators are involved including BK (Decarie, Adam et al. 1996), SP (Gilligan, Lovato et al. 1994), cytokines (Mazzon, Esposito et al. 2008) and histamine (Stochla and Maslinski 1982). Oedema can also be potentiated by the synthesis/release of vasodilatory prostaglandins (Thomas 1980). This phenomena is followed by an infiltration of leukocytes, particularly neutrophils in the first few hours (Werner and Szelenyi 1992) which is mainly dependent on the synthesis or expression of adhesion molecules in the endothelium and in the migrating cells induced by the same cytokines mentioned above.

If the released mediators, particularly cytokines, reach the circulation, they can cause fever by its actions in areas near the hypothalamus. Cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  can reach the vascular organs near the hypothalamus and induce the synthesis of cyclooxygenase-2 in the central nervous system which results in prostaglandin production. In the hypothalamus, prostaglandins can alter the adjacent neurons firing to produce fever (for a review see Li, Wang et al. 1999; Roth and De Souza 2001).

The alleviation of inflammation and particularly of pain may be important for many reasons. Briefly, pain can induce a stress response in patients which is associated with elevations in corticotrophin, cortisol, antidiuretic hormone, catecholamines, aldosterone, renin, angiotensin II, and glucose along with decreases in insulin (Chapman, Tuckett et al. 2008). Besides, acute pain can evolve to chronic pain if not treated (Young Casey, Greenberg et al. 2008). There are several analgesics used for treatment of a wide range of painful and inflammatory conditions which include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) (Ferreira 1972) and opioids (Fine, Mahajan et al. 2009). Apart from those, other drugs have been used for specific painful conditions (Vranken 2009; Zakrzewska 2010). In spite of the great diversity of available analgesic drugs, the important side effects as well as the ineffectiveness of some drugs in some painful conditions require the continuous search for new drugs.

The genus *Sinningia* belongs to the *Gesneriaceae* family and comprises 68 species, distributed in the South America, and many of them are found in Brazil (Chautems, Lopes et al. 2010). Chemical composition of *Sinningia* species has been

studied in the last few years. Flavonoids were isolated from *S. cardinalis* (Swinny, Bloor et al. 2000), while ethylcyclohexane derivatives and anthraquinones were found in *S. speciosa* (Verdan, Cervi et al. 2009). In *S. allagophylla*, lapachenol, 8-methoxylapachenol, anthraquinones and naphthoquinones were found (Riva, Barison et al. 2012). *S. aggregata* produces essential oil, anthraquinones and aromatic compounds with a new skeleton named aggregatins A-D (Stefanello, Cervi et al. 2005; Verdan, Barison et al. 2010).

Even though the chemical composition of these plants is beginning to be known, there are few studies addressing the pharmacological properties of the newly identified compounds. We have recently found that the ethanolic extract from *S. allagophylla* possess anti-nociceptive effects, an activity related, at least in part, to the presence of 8-methoxylapachenol (Barbosa, Mori et al. 2013). In addition, anthraquinones were also found in these species, a class of compounds usually associated with anti-inflammatory and anti-nociceptive activity in other species (Luo, Wong et al. 2010; Aoganghua, Nishiumi et al. 2011; Lu, Yang et al. 2011). These observations have guided us to investigate the possible antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of the ethanolic extract obtained from the tuber of *S. aggregata* (ESa). Once an antinociceptive activity was identified we investigated this activity on the fractions and isolated compounds obtained from the ESa. When we identified an antinociceptive activity in one of these compounds, AgD, we evaluated its effectiveness against several pain mediators, NO production and ion channels agonists in order to obtain some indications about its mechanism of action.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals**

The experiments were conducted using male Swiss mice (25-35 g), housed under a 12h light-dark cycle, with controlled humidity (60-80%), and temperature ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ). Food and water were freely available to the animals. Animals were acclimatized to the experiment room at least 2h before testing and were used only once throughout the experiments. The studies were carried out in accordance with the current Brazilian and International guidelines for the care of laboratory animals and were approved by the Institution's Ethics Committee for Animal Use. The

number of animals was the minimum necessary show consistent effects of the drugs treatments and all efforts were made to minimize animal suffering.

## 2.2 Plant material

*Sinningia aggregata* (Ker-Gawl.) Whiehler (tubers) was collected in Tibagi, Paraná State, Brazil, in May 2007 and was identified by Clarice B. Poliquesi. A voucher specimen (#290738) was deposited in the herbarium of Museu Botânico Municipal in Curitiba, Paraná, Brazil.

## 2.3 Extraction and isolation

Dried and powdered tubers (50.5 g) were extracted at room temperature with ethanol (3 x 200 mL) and the solvent was removed under reduced pressure to yield the crude ESa (4.2 g). This was suspended in ethanol-water 1:1, submitted to partition with petroleum ether (PE), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and 1-butanol (BuOH) and after solvent removal the fractions yielded 4.1%, 5.0%, 23.3% and 35.1%, respectively. Biological assays showed that the activity was concentrated in PE and EtOAc fractions. After chromatographic fractioning 2-methylantraquinone (0.5%) and 7-methoxy-2-methylantraquinone (0.5%) were isolated from PE fraction and AgD (3%) from EtOAc fraction. The compounds were identified by NMR 1D and 2D and comparison with literature data. Fingerprints obtained by HPLC of ESa together with the chemical structures of the identified compounds are showed in Figure 1 and the detailed procedure was described previously (Verdan, Barison et al. 2010)

## 2.4 Drugs

Carrageenan, lipopolysaccharide *E. coli* 0111:B4, indomethacin, BK, PGE<sub>2</sub>, Dopamine, forskolin, dybutiryl cAMP, glibenclamide, dipyrone, fentanyl, diazepam, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), ruthenium red, camphor, amiloride, capsaicin, cinnamaldehyde and menthol were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, USA. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CINC-1 were purchased from R&D Systems, Pittsburgh, USA.

Ketamine and xylazine were from Vetnil Veterinary Products, Syntec Laboratory, Cotia, Brazil.

Oxytetracycline hydrochloride was purchased from Pfizer Laboratories, São Paulo, Brazil. Dexamethasone (Cort-Trat ®) from Química Santa Marina, Rio de Janeiro, Brazil.

## **2.5 Carrageenan-induced oedema**

Oedema was measured as described before (Kassuya, Cremoneze et al. 2009). Briefly, mice were orally treated with ESa (10-100 mg/kg), or vehicle (Tween 20 1%) or dexamethasone (1 mg/kg, positive control) and after 1h they received a 50 µl s.c. injection into the right paw of carrageenan (300 µg/paw) suspended in sterile 0.9% saline. Contralateral paw received only saline and was used as control. Oedema was measured using a digital micrometer (Great, MT-045B, Shanghai, China) and expressed as the difference between the paw thickness (in µm) 1 h before and at different time points (0.5, 1, 2 and 4 h) after carrageenan injection.

## **2.6 Lipopolysaccharide-induced fever**

Abdominal body temperature was measured using data loggers (Subcue data loggers, Calgary, Canada) as described earlier (Kassuya, Cremoneze et al. 2009). The data loggers were implanted intraperitoneally under ketamine-xylazine (60-7.5 mg/kg) anaesthesia and aseptic conditions 1 week prior to the experiment. Animals were treated with oxytetracycline hydrochloride (50 mg/kg i.m.) after surgery. Body temperature was continuously monitored and recorded at 15-min intervals from 2 h before until 6 h after an i.p. injection of lipopolysaccharide (100 µg/kg). Controls were treated with the same volume of pyrogen-free saline (vehicle). ESa (30 mg/kg) or vehicle (Tween 20 1%) was administered by oral route 1 h before lipopolysaccharide injection. During the experiment, room temperature was kept at 30 ±1 °C (thermoneutral zone for mice) (Rudaya, Steiner et al. 2005).

## **2.7 Carrageenan-induced neutrophil migration**

To investigate the effect of ESa on neutrophil migration animals were treated with ESa (10-100 mg/kg, p.o.) or vehicle (Tween 20 1%) or dexamethasone (1

mg/kg, positive control) and after 1 h with Carrageenan (300 µg/paw) or saline. Animals were killed 4 h after carrageenan injection, the tissues of the injected paws were removed, processed and the myeloperoxidase activity was assessed as described before (De Young, Kheifets et al. 1989). Protein content in the samples was measured using Bradford's method. The enzymatic activity was determined by measuring the optical density at 630 nm and was expressed as O.D. per mg of protein.

## **2.8 Formalin-induced nociception**

The procedure used was similar to that described previously (Hunskar and Hole 1987). Briefly, animals were placed in glass cylinders of 20 cm diameter for adaptation for 30 min. Mice were then treated with the ESa (10-100 mg/kg), fractions PE (1.25 mg/kg), DCM (1.50 mg/kg), EtOAc (7.00 mg/kg), or the isolated compounds AgD (0.21 mg/kg), methylanthraquinone (1.25 mg/kg), 7-methoxy-2-methylanthraquinone (1.25 mg/kg) by oral route in different experiments, 1 h before injection of the 20 µL of 2.5% formalin (0.92% formaldehyde), made up in phosphate-buffered solution, in the right hind paw. Control animals received the same volume of vehicle (10 mL/kg, Tween 20 1%, p.o.) or indomethacin (5 mg/kg, p.o., positive control). The time that animals spent licking and elevating the injected paw (nociceptive behaviour) was recorded in blocks of 5-min during 30 min. The first 5-min period was considered as phase I of the test (neurogenic phase) and the phase II (inflammatory phase) was registered from 15 to 30 min.

## **2.9 Carrageenan-induced mechanical hyperalgesia**

The mechanical threshold was measured by using von Frey filaments (Stoeling, Chicago, USA) in the up-and-down paradigm as described previously (Dixon 1980; Chaplan, Bach et al. 1994). First, mice were acclimated (1 h) in individual clear Plexiglas boxes (9 x7x 11 cm) on an elevated wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the hind paws. Then, the paw was touched with a series of eight von Frey hairs in logarithmic increments of force (0.008, 0.02, 0.07, 0.16, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 g). The von Frey hairs were applied perpendicular to the plantar surface with sufficient force to cause slight buckling against the paw and held

for approximately 2 to 4 s. Absence of paw lifting after this time led to the use of the next filament with increased weight, whereas paw lifting indicated a positive response and led to the use of the next weaker filament. This paradigm continued until six measurements were collected. The 50% mechanical paw withdrawal threshold was then calculated from these scores as described previously (Dixon 1980). The animals were then treated with ESa (3-30 mg/kg) or the isolated compound AgD (0.21 mg/kg) by oral route (p.o.) or locally (into right or into left paw) with AgD (0.07-7 ng/paw) or the respective vehicles (Tween 20 1%, 10 ml/kg p.o. or Tween 20 0.1% in sterile saline, 20  $\mu$ L locally applied). Sixty min after oral or 15 min after local treatment animals received 20  $\mu$ L injection, into the right hind paw, of carrageenan (300  $\mu$ g/paw). The withdrawal response was measured again 3 h after Carrageenan injection.

In a second series of experiments animals were treated with AgD (7 ng/paw) or the positive control dipyrone (320  $\mu$ g/paw) or vehicle (Tween 20 0.1%) and after 15 min they received local injections of different nociceptive stimuli: TNF- $\alpha$  (1 pg/paw), IL-1 $\beta$  (0.5 pg/paw), CINC-1 (10 pg/paw), PGE<sub>2</sub> (100 ng/paw), BK (500 ng/paw), Dopamine (3  $\mu$ g/paw), dybutiryl cAMP (dbAMPc, 5  $\mu$ g/paw) and forskolin (1  $\mu$ g/paw). The mechanical hyperalgesia was measured after 3 h.

In order to evaluate the participation of K<sup>+</sup> channels in the antinociceptive activity of AgD, animals were treated with vehicle (Tween 80 1% in sterile saline) or glibenclamide (80  $\mu$ g/paw) and after 30 min they received AgD (7 ng/paw) or the positive control dipyrone (320  $\mu$ g/paw) or vehicle (Tween 20 0.1%). After 15 min animals received local injections PGE<sub>2</sub> (100 ng/paw). Dipyrone was included as positive control in this series of experiments because it has been shown to block the hyperalgesia of all these stimuli. The doses of nociceptive stimuli, dipyrone and glibenclamide were based on previous studies (Alves and Duarte 2002; Cunha, Verri et al. 2004; Cunha, Verri et al. 2005; Dina, Hucho et al. 2005; Otuki, Ferreira et al. 2005; Cunha, Verri et al. 2007).

## 2.10 Hot-plate test

The hot-plate test was used according to the method described before (Kassuya, Cremoneze et al. 2009). Hot-plate temperature was kept at 55  $\pm$  1°C. Basal latency was measured and only animals showing a basal latency between 10-

15 s were used. After 30 min, mice were orally treated with ESa (30 mg/kg), AgD (0.21 mg/kg), vehicle (Tween 20 1%) or with fentanyl (0.5 mg/kg, s.c.) used as a positive control. One hour after the treatment with extract, compound and vehicle, or 15 min after treatment with Fent, postdrug latency was evaluated. Cut-off time was 30 s. Hot-plate latencies were then converted to the percentage of maximal possible effect (%MPE) calculated as follows:  $\%MPE = (\text{postdrug latency} - \text{basal latency}) / (\text{cut-off time} - \text{basal latency}) \times 100$ .

### **2.11 Locomotor performance**

To evaluate the possible nonspecific muscle-relaxant or sedative effects of the ESa and AgD, mice were subjected to the rota rod (Ugo Basile, Model 7600, Varese, Italy) task (Kassuya, Cremonese et al. 2009). Animals were treated with ESa (30 mg/kg), AgD (0.21 mg/kg), vehicle (Tween 20 1%) or diazepam (5.0 mg/kg, s.c., positive control) and after 1 h submitted to the rota rod task. Cut-off time was set at 180 s.

### **2.12 Nitric oxide production by peritoneal macrophages.**

Mice peritoneal macrophages were obtained as previously described (Moretao, Zampronio et al. 2004). Briefly, the peritoneal cavity of halothane-anesthetized mice was washed with 6 ml of sterile PBS containing 5U/ml heparin. The fluid was then centrifuged at 1000 g, 4°C for 10 min to separate the cells. Cells were then resuspended in RPMI 1640, pH 7.4 and washed twice. Cells ( $10^6$  cells/well) were then placed in a 96-well plate and left to adhere for 1h at 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The non-adherent cells were washed away with RPMI 1640. The adhered cells receive RPMI 1640 medium containing AgD (4, 40, 400, 4000 ng/ml) with or without LPS (100 ng/ml). Control monolayers received only RPMI1640 or dexamethasone (9 µg/ml) plus LPS. Samples were collected after 4 h and kept at -20°C for NO evaluation using the Griess reaction as described before (Green, Wagner et al. 1982). For viability evaluation, the cells received 100 µl MTT 5mg/ml in RPMI 1640 and were incubated for 24 h at 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After this period, the formazan precipitate was dissolved with 10 % SDS solution containing 1M HCl and the

absorbance at 550 nm was evaluated after 4 h (Mosmann 1983; Tada, Shiho et al. 1986).

### **2.13 Nociception induced by TRP channel agonists**

To test if TRPV<sub>1</sub>, TRPA<sub>1</sub>, TRPM<sub>8</sub> and ASIC receptors might constitute potential specific targets for the antinociceptive actions of AgD, we tested the effects of the later against nociceptive responses elicited by activators of each channel. Ten min following local treatment with AgD (7 ng/paw) or with the positive controls ruthenium red (nonselective TRP antagonist, 2 nmol/paw), camphor (TRPA<sub>1</sub> antagonist, 250 ng/paw) or amiloride (epithelial Na<sup>+</sup> channel blocker, 3 µg/paw) mice received a single 20 µL i.pl. injection of either TRPV<sub>1</sub> agonist capsaicin (0.1 nmol/paw), TRPA<sub>1</sub> agonist cinnamaldehyde (10 nmol/paw), the ASIC agonist acidified saline (2% acetic acid in 0.9% saline, pH 1.98, 20 µl/paw) or TRPM<sub>8</sub> agonist menthol (2.4 µmol) delivered into the ventral surface of the right paw. Each animal was then placed, immediately and alone, into a glass cylinder of 20 cm diameter positioned on a platform in front of a mirror to enable full view of hind paws. The amount of time spent licking the injected paw used as an index of nociceptive behavior intensity, was recorded with a chronometer during 5 min (for capsaicin or cinnamaldehyde) or 20 min (acidified saline and menthol). The doses were based on previous studies (Andrade, Luiz et al. 2008; Baggio, Freitas et al. 2012)

### **2.14 Statistical analysis**

The results are presented as the mean ± s.e.mean. The statistical significance among the groups was assessed using the Two-Way analysis of variance for repeated measures (oedema and fever) or One-Way analysis of variance for the further experiments, in both cases followed by Bonferroni's test. *P* values less than 0.05 were considered an indication of significance.

## **3 RESULTS**

### **3.1 Effect of ESa on carrageenan-induced oedema and neutrophil migration and on LPS induced fever**



Carrageenan injection in the paw induced an oedema that started at 30 min and peaked at 2 h (Figure 2A). Carrageenan also increased myeloperoxidase activity (an indicative of neutrophil migration) in the paw after 4 h (Figure 2B). The oral treatment of the animals with ESa (10-100 mg/kg) did not inhibit the carrageenan-induced paw oedema or the myeloperoxidase activity while dexamethasone significantly reduced both (Figure 2A and 2B, respectively). The i.p. injection of lipopolysaccharide induced a febrile response that started 1.5-2 h after the injection and persisted until 4-4.5 h. The oral treatment of the animals with ESa (30 mg/kg) did not change lipopolysaccharide-induced fever (Figure 2C).

### **3.2 Effect of ESa on formalin-induced nociception and carrageenan-induced mechanical hyperalgesia**

Formalin injection induced the nociceptive behavior during approximately 136 s on phase I and of 190 s on phase II (Figure 3A). ESa (10-100 mg/Kg) caused a significant inhibition of inflammatory phase (phase II) of formalin-induced licking with a maximal reduction observed of  $69\pm 10\%$  while no inhibition was seen in the neurogenic phase (phase I). These results were similar to those obtained with indomethacin, which was ineffective on phase I but inhibited  $52\pm 9\%$  of the phase II (Figure 3A).

The injection of carrageenan in the hind paw of the mice induced a significant reduction in the mechanical threshold 3 h after the injection (Figure 3B). The oral treatment of the animals with ESa (3-30 mg/kg) dose-dependently inhibited the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (Figure 3B). Indomethacin showed similar effect on the mechanical hyperalgesia.

### **3.3 Effect ESa in the hot-plate test and motor performance**

ESa 30 mg/kg administered by oral route did not change the latency time in the hot-plate test at  $55^{\circ}\text{C}$  when compared with vehicle-treated animals while fentanyl caused a significant increase in %MPE compared to vehicle-treated animals (Figure 3C). Similarly, ESa administered by the oral route (at the same dose and time point that inhibited nociception) did not significantly affect the motor behaviour of the animals tested for motor performance on the rota rod task when compared to animals that received only the vehicle (control group). Conversely, the positive control

diazepam significantly reduced the motor coordination of animals (Figure 3D, inhibition of  $79\pm 9\%$ ).

### **3.5 Effects of ESa fractions on formalin-induced nociception**

The oral treatment with the fractions PE and EtOAc at doses of 1.25 mg/kg and 7 mg/Kg, respectively, but not with the DCM fraction 1.5 mg/kg (doses based on the yielding) obtained from ESa, significantly inhibited the phase II of the formalin-induced nociceptive behavior with a maximal inhibition of  $57\pm 7\%$  for PE and  $43\pm 8\%$  for EtOAc without changing the phase I (data not shown). Similar results were obtained for the positive control Ind in this experiment ( $55\pm 9\%$  reduction on phase II, data not shown).

### **3.6 Effect of the isolated compounds on formalin-induced nociception and on Carrageenan-induced mechanical hyperalgesia**

The treatment of the animals with AgD (0.21 mg/kg, p.o) a compound isolated from EtOAc fraction caused a significant inhibition of inflammatory phase of formalin-induced licking with a maximal inhibition of  $56\pm 7\%$  but no significant changes were observed in the first phase (Figures 4A). The treatment of the animals with methylantraquinone and 7-metoxy-2-methylantraquinone obtained from fraction PE did not change the nociceptive behavior induced by formalin (data not shown).

The injection of carrageenan in the hind paw of the mice significantly reduced the mechanical threshold after 3 h (Figure 4B). The oral treatment of the animals with AgD (0.21 mg/kg) abolished the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (Figure 4B).

The local treatment with AgD reduced dose-dependently the carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (Figure 4C) 3 h after carrageenan injection. AgD 0.7 and 7 ng significantly reduced the mechanical hyperalgesia (inhibition of 41 and 66%, respectively), while a lower dose of this compound (0.07 ng) had no effect. Dipyrone (320  $\mu$ g), used as positive control, had similar effects (inhibition of 57%, Figure 4C). Additionally, AgD administered into contralateral paw (in relation to carrageenan) had no significant effect on the mechanical hyperalgesia in contrast with the total inhibition observed when the administration of AgD was done in the

same paw as carrageenan (Figure 4D). As the dose of 7 ng of AgD showed the best effect, this dose was chosen for the subsequent experiments.

### **3.7 Effect AgD in the hot plate test and motor performance**

AgD, administered by oral route (at the same doses that inhibited nociception) did not change the latency time in the hot-plate test at 55°C when compared with vehicle-treated animals while Fent caused a significant increase in %MPE compared to vehicle-treated animals (data not shown). Similarly, AgD administered by oral route (at the same doses and time points that inhibited nociception) did not significantly affect the motor behaviour of the animals tested for motor performance on the rota rod task when compared to animals that received only the vehicle (data not shown).

### **3.8 Effect of AgD on BK-,TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - and CINC-1-induced mechanical hyperalgesia**

The injection of BK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CINC-1 in the paw induced a significant reduction of the mechanical threshold (Figure 5A-D). The local treatment with AgD (7 ng/paw) reverted the mechanical hyperalgesia induced by BK and cytokines by 84, 55, 50 and 59%, respectively. Dipyron, used as positive control, also inhibited mechanical hyperalgesia induced by BK and the cytokines in 57, 63, 50 and 59% respectively.

### **3.9 Effect of AgD on PGE<sub>2</sub>-, Dopamine-, Forskolin- and dbAMPc- induced mechanical hyperalgesia**

The injection of PGE<sub>2</sub>, dopamine, forskolin and dbcAMPc in the paw induced a significant reduction of the mechanical threshold (Figure 6A-D). The local treatment with AgD (7 ng/paw) reduced the mechanical hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub> and dopamine by 64 % and 78 %, respectively (Figure 6A and 6B). However AgD did not change the reduction in the mechanical threshold induced by forskolin and dbAMPc (Figure 6C and 6D). Dipyron, used as a positive control, reduced the mechanical hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub>, dopamine, forskolin and dbAMPc by approximately 76, 80, 89, and 67 %, respectively.

### **3.10 Effect of Glibenclamide on the antinociceptive effect of AgD**

The injection of PGE<sub>2</sub> induced a reduction of approximately 78% in the mechanical threshold of the mice paw (Figure 7). As showed before the treatment of the animals both AgD and dipyrone completely reversed the mechanical hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub>. In turn, the administration of the potassium channel blocker glibenclamide prevented the antinociceptive effect dipyrone (positive control) but not that from AgD (Figure 7).

### **3.11 Effect of AgD on NO release**

Basal production of NO (mesured as nitrite/nitrate) by peritoneal macrophages was not significantly changed by the treatment of the cells with AgD, although a small reduction was in the NO concentration was verified with all concentratins tested (Figure 8). LPS significantly increased the NO production but the treatment of the cells with AgD did not modify this production (Figure 8). Conversely, the treatment of the cells with the glucocorticoids dexamethasone abolished the increase in NO production induced by LPS (Figure 8). None of the treatments significantly altered the cell viability which was always higher than 95%.

### **3.12 Effect of AgD on the nociception induced by Cap, Cin, AA and Men**

Capsaicin, cinnamaldehyde, acidic saline and menthol, when injected in the hindpaw of the animals, induced a clear nociceptive behavior (Figure 9) different from saline-treated animals where most of the time did not show any response. The pretreatment of the animals with these channels blockers ruthenium red, camphor and amiloride decreased significantly the nociceptive behavior induced by these compounds (Figure 9A-C). AgD had no effect on the nociceptive behavior induced by activators of TRPV1, TRPA1, TRPM8 and ASIC3, respectively capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidic saline (Figure 9).

## 4 DISCUSSION

The present results show that the ethanolic extract obtained from the tubers of *S. aggregata* has an important antinociceptive activity since it blocked the inflammatory phase of the overt nociception induced by formalin and the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan. However, the ESa did not show an anti-inflammatory or antipyretic effect. A new compound found in this plant, AgD shared similar antinociceptive activity acting probably at peripheral sites. In addition, AgD blocked the mechanical hyperalgesia induced by BK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1, PGE<sub>2</sub> and dopamine but not that induced by forskolin or dbcAMP, capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acidic saline. The analgesic effect of AgD also does not involve NO/GMPc/K<sup>+</sup> channels. These results suggest that AgD may have mechanism of action different from the known analgesics.

The initial pharmacological tests designed to evaluate the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of ESa showed that this extract given by oral route possess no anti-inflammatory or antipyretic activity, at the doses used, but reduced the inflammatory phase of formalin-induced nociception and inhibited the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan. The antinociceptive activity of ESa was similar to that observed with the standard NSAID indomethacin, a well-known non-selective cyclooxygenase inhibitor. These results suggest that ESa may be blocking some inflammatory mediator synthesis, release or action. ESa is an interesting extract since analgesic drugs such as NSAID, different from what we observed with ESa, also inhibits to some extent the oedema formation (Amir and Kumar 2007). Dipyron and acetaminophen are the only analgesics that are known for their weak anti-inflammatory action (Lorenzetti and Ferreira 1985; al-Swayeh, Futter et al. 2000). However, both dipyron and acetaminophen are effective in blocking fever at doses similar or lower than the analgesic doses (De Souza, Cardoso et al. 2002; Kanashiro, Pessini et al. 2009). In contrast, opioids, another class of commonly used analgesic drugs, do not block fever but are very effective in blocking both the first phase (neurogenic phase) and the second phase of formalin-induced nociceptive behaviour in mice (Hunskar and Hole 1987). Therefore, these data suggested that ESa could have compound(s) with antinociceptive activity acting through a particular mechanism. The dose-dependent inhibition of mechanical

hyperalgesia by ESa also suggests that this extract contains compound(s) that act specifically in the sensitization of the nociceptor.

After fractioning, two of these ESa-derived fractions showed a similar antinociceptive activity: the PE fraction and EtOAc fraction. From PE fraction it was possible to isolate two anthraquinones, 2-methylantraquinone and 7-methoxy-2-methylantraquinone. Anthraquinones are potentially antinociceptive drugs. For example, Quintão and co-workers showed that the anthraquinone diacerhein, which is used to treat osteoarthritis, possess antinociceptive activity (Quintao, Medeiros et al. 2005). Emodin is another anthraquinone that possess antinociceptive effects in neuropathic pain (Gao, Liu et al. 2011). Nevertheless, both anthraquinones obtained from the PE fraction, at the doses tested, fail to change the nociceptive behaviour induced by formalin. Higher doses were not tested but it is unlikely that these anthraquinones are responsible for the antinociceptive activity seen in the ESa since the doses used were the same as the PE fraction. It is noteworthy that sitosterol was also found in the PE fraction, a compound with known antinociceptive activity (Villasenor, Angelada et al. 2002). However it is also improbable that the antinociceptive activity evidenced in PE can be attributed to the presence of this compound since the dose of PE used (1.25 mg/kg) is almost 10 times lower than the antinociceptive dose of sitosterol (100 mg/kg) (Villasenor, Angelada et al. 2002). Therefore, it is possible that other anthraquinones different from the ones we found or other compounds present in PE are responsible for the antinociceptive activity of this fraction. This will be an issue for future studies since they certainly contribute for the antinociceptive activity observed in ESa.

Conversely, a new naphtoquinone derivative named AgD was found in the EtOAc fraction. AgD was very effective in blocking the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan and in reducing formalin-induced nociception. These data suggested that, at least in part, the antinociceptive activity observed in ESa is related to the presence of AgD. ESa and AgD were effective in the inflammatory but not in the neurogenic phase of the formalin-induced nociceptive behaviour and it is noteworthy that the doses of ESa and AgD that completely abolished carrageenan-induced hyperalgesia only partially reduced the nociceptive behaviour induced by formalin. This may be due to the fact that formalin evokes a very complex behaviour that implicates substances that activate the nociceptor and substances that only sensitizes the nociceptor. As mentioned before, ESa may contain compounds which

act specifically in the sensitization of the nociceptor and one of these compounds is AgD since, at a dose based in the yielding completely reversed the mechanical hyperalgesia. Therefore, the blockage of hyperalgesia by AgD affects only partially the nociception induced by formalin since other endogenous mediators related to the activation of the nociceptor could still be acting.

Antinociceptive activity has been also ascribed to other naphthoquinones. Vitamin K2 (menatetrenone) blocked the inflammatory phase of the formalin test and tail-pressure test in mice (Onodera, Shinoda et al. 2000). However, the doses necessary to achieve the antinociceptive activity were superior to the ones we used for AgD. Some studies have also shown that known naphthoquinones might have antinociceptive/anti-inflammatory activity since they were able to inhibit NF- $\kappa$ B activity *in vitro*. Song et al. showed that isoeleutherin suppressed the expression of inducible NO synthase and various cytokines by inhibiting NF- $\kappa$ B activity (Song, Min et al. 2009). Similarly, Ahn et al. showed that a furonaphthoquinone compound suppressed cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages which could grant a potential anti-inflammatory activity to this compound (Ahn, Kim et al. 2005). It seems important to emphasize two points. Anti-inflammatory or antipyretic activities were not tested for AgD although it seems unlikely that this compound would show any of these activities since they were absent in ESa. Second, mechanisms of action as suggested above (NF- $\kappa$ B or cyclooxygenase-2 inhibition) do not seem to be the mechanism by which ESa and for AgD are blocking carrageenan-induced hyperalgesia since they would also show anti-inflammatory and antipyretic activity. In addition, we showed here that the treatment of macrophages with AgD slightly reduced basal NO production (not significantly) but did not change the lipopolysaccharide-induced NO production in any of the concentrations tested. Therefore, AgD does not seem to have a similar effect than that observed for isoeleutherin by Song et al. (Song, Min et al. 2009).

AgD was also very effective in reducing mechanical hyperalgesia when administered locally suggesting that AgD exerts its antinociceptive effects by acting directly at the inflammatory site. The local effect was confirmed when the same dose of AgD injected in the contralateral paw showed no antinociceptive effect and also suggests that the activity is not related to any metabolite generated in the liver. Additionally, ESa and AgD failed to produce antinociceptive effects when a thermal stimulus (hot plate) was used which substantiate their preferential peripheral action in

nociceptive responses of inflammatory origin. We also confirmed, using the rota rod test, that both ESa and AgD, at the doses used, were not affecting the motor performance of the animals which could affect the result of the nociceptive tests.

As mentioned before, the mechanical hyperalgesia induced by carrageenan in mice depends on the release of a cascade of cytokines. Then, BK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and keratinocyte-derived chemokine (KC) precede the release of sympathetic amines and prostaglandins (Cunha, Poole et al. 1992; Ferreira 1993; Verri, Cunha et al. 2006). Based on this sequence of mediators released during mechanical hyperalgesia induced by carrageenan, we tried to unravel how AgD would be acting. Our results clearly showed that the compound prevented sensitization induced by BK, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and CINC-1, a chemokine that shares the same receptor with KC (de Oliveira Fusaro, Pelegrini-da-Silva et al. 2010). These results suggested that AgD was not blocking the synthesis or release of these mediators but acting after their release in the inflammatory site.

However, AgD also significantly reduced the mechanical hyperalgesia induced by both PGE<sub>2</sub> and dopamine, which were previously described as the final mediators generated by the above mentioned mediators responsible for the sensitization that occurs during inflammatory pain (Ferreira 1993; Cunha, Verri et al. 2005; Verri, Cunha et al. 2006). PGE<sub>2</sub> biosynthesis depends on the conversion of membrane arachidonic acid by the action of cyclooxygenase (Ferreira 1972). Once released, this prostanoid interacts with G protein-coupled receptors subtypes EP<sub>2</sub> and/or EP<sub>4</sub> expressed in peripheral sensory neurons. The activation of these receptors results in activation of adenylyl cyclase and increased levels of cAMP that directly promote the activation of protein kinase A. Protein kinase A, in turn, exert its effects on various ion channels which will sensitize the nociceptor (Southall and Vasko 2001; Narumiya 2009). Alternatively, sympathetic amines have also been shown to be involved in the development of hyperalgesia by functionally up-regulating nociceptors (Coderre, Abbott et al. 1984; Duarte, Nakamura et al. 1988). Dopamine is a sympathetic amine that is released during inflammation and promotes direct sensitization of nociceptive neurons in a manner dependent on the activation of D1 receptors which stimulates adenylyl clyclase/cAMP pathway (Memo, Missale et al. 1986; Khasar, Miao et al. 1998; Missale, Nash et al. 1998; Villarreal, Funez et al. 2013).



Therefore the following step was to evaluate if AgD could reverse the mechanical hyperalgesia by acting on these intracellular components. Mechanical hyperalgesia was induced by the adenylyl cyclase activator forskolin and by dbAMPC, a permeable analogue of cAMP which is a direct activator of protein kinase A. Our results demonstrated that both, forskolin and dbAMPC reduced paw withdrawal threshold at the same extent that PGE<sub>2</sub> and dopamine. However, at the dose that we tested, AgD was unable to reverse mechanical hyperalgesia induced by these agents. As expected by the reasons discussed below, the positive control dipyrone was able to reduce the mechanical hyperalgesia induced by all stimuli (Lorenzetti and Ferreira 1985; Duarte, dos Santos et al. 1992; Cunha, Verri et al. 2005). These results suggest that AgD is acting between the activation of the G-protein coupled receptors and the activation of adenylyl-cyclase/cAMP pathway.

Dipyrone has a specific antinociceptive effect on PGE<sub>2</sub>-induced hyperalgesia, which are not shared by cyclooxygenase inhibitors such as indomethacin. Beirith et al. found that dipyrone, similarly to AgD, was unable to reverse the nociceptive behavior observed in the hot plate test (Beirith, Santos et al. 1998). Lorenzetti & Ferreira and Duarte et al. showed that the peripheral effect of dipyrone is mediated by the activation of L-arginine/NO/cGMP pathway (Lorenzetti and Ferreira 1985; Duarte, dos Santos et al. 1992). Subsequently, Alves & Duarte (2002), demonstrated that the antinociceptive effect of dipyrone in PGE<sub>2</sub> induced mechanical hyperalgesia could be completely reversed by local application of glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker. Furthermore, it was demonstrated that not only the peripheral antinociceptive effect of dipyrone but also of other analgesic drugs, such as morphine and diclofenac, involves the participation of L-arginine/NO/cGMP/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway (Alves & Duarte, 2002, Rodrigues & Duarte, 2000, Ortiz et al., 2003). In sharp contrast with dipyrone, the antinociceptive action of AgD was not reversed by glibenclamide confirming that AgD is not acting through this pathway.

The reduction in the withdrawal threshold of the mice paw induced by BK may occur independently of cytokine release (Cunha, Verri et al. 2007). This peptide may cause nociception by its ability to directly activate nociceptors (Petho and Reeh 2012) or by inducing the release of prostanoids and sympathetic amines (Taiwo and Levine 1988; Ferreira 1993; Khasar, Miao et al. 1998). Furthermore, BK binds to its G protein-coupled receptor B<sub>2</sub> which is constitutively expressed in nociceptive fibers

and promotes the activation of protein Gq/11 followed by the release of the second messengers inositol triphosphate and diacylglycerol (Dray, Bettaney et al. 1988; Petho and Reeh 2012). The latter is responsible for the nociceptive behavior, as it promotes the activation of protein kinase C which can phosphorylate various ion channels (Gutowksi, Smrcka et al. 1991; Barber and Vasko 1996; Petho and Reeh 2012). As AgD effectively reduced the nociception induced by BK, we decided also to test if this compound could be acting on ion channels.

The transient receptor potencial (TRP) channels, one of the largest families of ion channels, are taken as signal transducers that may participate in nociception (Levine and Alessandri-Haber 2007). We observed that the compound was ineffective in inhibiting the nociceptive behavior induced by capsaicin, a vanilloid compound able activate the TRPV<sub>1</sub> channel, by cinnamaldehyde, an agonist for TRPA<sub>1</sub> channel, by acidic saline that activates ASIC<sub>3</sub> and by menthol, an agonist for TRPM<sub>8</sub> (Levine and Alessandri-Haber 2007). Conversely, the nociceptive response produced by capsaicin was significantly reduced by ruthenium red, an inorganic polycationic dye that non-selectively blocks response to several TRP channels. In addition, the nociceptive responses induced by cinnamaldehyde and acidic saline were blocked by camphor and amiloride, respectively, TRPA<sub>1</sub> and ASIC antagonists. These results confirm that AgD is not acting on these channels.

In conclusion, Esa have an important anti-nociceptive activity at doses that are not anti-pyretic or anti-inflammatory. This antinociceptive activity is related, at least in part, to the presence of AgD, a new compound found in this *Sinningia* species. AgD, at nanomolar doses showed a significant reduction inflammatory pain by acting primarily on prevention of sensitizing actions of the major mediators of inflammatory pain, such as PGE<sub>2</sub>, BK and dopamine. Its antinociceptive effect is peripheral and is different from classical NSAID and dipyrone. It is possible that AgD interferes in some step between G-coupled receptors activation and cAMP formation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Araucária Foundation of the State of Paraná and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil.

## REFERENCES

- Ahn, K. Y., B. H. Kim, et al. (2005). "Dual inhibitory effects of furonaphthoquinone compound on enzyme activity and lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in macrophages." Biochem Biophys Res Commun **336**(1): 93-99.
- al-Swayeh, O. A., L. E. Futter, et al. (2000). "Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity." Br J Pharmacol **130**(7): 1453-1456.
- Alves, D. and I. Duarte (2002). "Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron." Eur J Pharmacol **444**(1-2): 47-52.
- Amir, M. and S. Kumar (2007). "Synthesis and evaluation of anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation properties of ibuprofen derivatives." Acta Pharm **57**(1): 31-45.
- Andrade, E. L., A. P. Luiz, et al. (2008). "Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice." Neuroscience **152**(2): 511-520.
- Aoganghua, A., S. Nishiumi, et al. (2011). "Inhibitory effects of vitamin K-3 derivatives on DNA polymerase and inflammatory activity." International Journal of Molecular Medicine **28**(6): 937-945.
- Baggio, C. H., C. S. Freitas, et al. (2012). "Antinociception of beta-D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition." International Journal of Biological Macromolecules **50**(3): 872-877.
- Barber, L. A. and M. R. Vasko (1996). "Activation of protein kinase C augments peptide release from rat sensory neurons." J Neurochem **67**(1): 72-80.
- Barbosa, F. L., L. S. Mori, et al. (2013). "Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and 8-Methoxylapachenol from *Sinningia allagophylla* Tubers." Basic Clin Pharmacol Toxicol.
- Beirith, A., A. R. Santos, et al. (1998). "Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action." Eur J Pharmacol **345**(3): 233-245.
- Chaplan, S. R., F. W. Bach, et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." J Neurosci Methods **53**(1): 55-63.
- Chapman, C. R., R. P. Tuckett, et al. (2008). "Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions." J Pain **9**(2): 122-145.
- Chautems, A., T. C. C. Lopes, et al. (2010). "Taxonomic revision of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) IV: six new species from Brazil and a long overlooked taxon." Candollea **65**(2): 241-266.
- Coderre, T. J., F. V. Abbott, et al. (1984). "Effects of peripheral antisymphathetic treatments in the tail-flick, formalin and autotomy tests." Pain **18**(1): 13-23.

Cunha, F. Q., S. Poole, et al. (1992). "The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia." Br J Pharmacol **107**(3): 660-664.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., et al. (2007). "TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor." Eur J Pharmacol **573**(1-3): 221-229.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., et al. (2005). "A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1755-1760.

Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., et al. (2004). "An electronic pressure-meter nociception paw test for mice." Braz J Med Biol Res **37**(3): 401-407.

de Oliveira Fusaro, M. C., A. Pelegrini-da-Silva, et al. (2010). "P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE(2) or dopamine." Eur J Pharmacol **649**(1-3): 177-182.

De Souza, G. E., R. A. Cardoso, et al. (2002). "A comparative study of the antipyretic effects of indomethacin and dipyron in rats." Inflamm Res **51**(1): 24-32.

De Young, L. M., J. B. Kheifets, et al. (1989). "Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents." Agents Actions **26**(3-4): 335-341.

Decarie, A., A. Adam, et al. (1996). "Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9] BK in carrageenan-induced edema." Peptides **17**(6): 1009-1015.

Denadai-Souza, A., L. Camargo Lde, et al. (2009). "Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint." Eur J Pain **13**(8): 812-819.

Dina, O. A., T. Hucho, et al. (2005). "Primary afferent second messenger cascades interact with specific integrin subunits in producing inflammatory hyperalgesia." Pain **115**(1-2): 191-203.

Dixon, W. J. (1980). "Efficient analysis of experimental observations." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 441-462.

Dray, A., J. Bettaney, et al. (1988). "Bradykinin-induced stimulation of afferent fibres is mediated through protein kinase C." Neurosci Lett **91**(3): 301-307.

Duarte, I. D., I. R. dos Santos, et al. (1992). "Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway." Eur J Pharmacol **217**(2-3): 225-227.

Duarte, I. D., M. Nakamura, et al. (1988). "Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice." Braz J Med Biol Res **21**(2): 341-343.

Ferreira, S. H. (1972). "Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia." Nat New Biol **240**(102): 200-203.

Ferreira, S. H. (1993). "The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics." Drugs **46 Suppl 1**: 1-9.

Fine, P. G., G. Mahajan, et al. (2009). "Long-acting opioids and short-acting opioids: appropriate use in chronic pain management." Pain Med **10 Suppl 2**: S79-88.

Gao, Y., H. Liu, et al. (2011). "Effect of emodin on neuropathic pain transmission mediated by P2X2/3 receptor of primary sensory neurons." Brain Res Bull **84**(6): 406-413.

Gilligan, J. P., S. J. Lovato, et al. (1994). "Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P." Inflammation **18**(3): 285-292.

Green, L. C., D. A. Wagner, et al. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-138.

Gutowski, S., A. Smrcka, et al. (1991). "Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones." J Biol Chem **266**(30): 20519-20524.

Hunskar, S. and K. Hole (1987). "The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain." Pain **30**(1): 103-114.

Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-210.

Kanashiro, A., A. C. Pessini, et al. (2009). "Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **296**(5): R1631-1640.

Kassuya, C. A., A. Cremonese, et al. (2009). "Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae)." J Ethnopharmacol **124**(3): 369-376.

Khasar, S. G., J. P. Miao, et al. (1998). "Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents." Eur J Neurosci **10**(2): 435-444.

Levine, J. D. and N. Alessandri-Haber (2007). "TRP channels: targets for the relief of pain." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 989-1003.

Li, S., Y. Wang, et al. (1999). "The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice." Brain Res **825**(1-2): 86-94.

Lorenzetti, B. B. and S. H. Ferreira (1985). "Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia." Eur J Pharmacol **114**(3): 375-381.

Lu, Y., J. H. Yang, et al. (2011). "Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation." Biochemical Pharmacology **82**(11): 1700-1708.

Luo, P., Y. F. Wong, et al. (2010). "Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Plumbagin through Inhibition of Nuclear Factor-kappa B Activation." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **335**(3): 735-742.

Mazzon, E., E. Esposito, et al. (2008). "Effect of tumour necrosis factor-alpha receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept." Clin Exp Immunol **153**(1): 136-149.

Memo, M., C. Missale, et al. (1986). "Pharmacology and biochemistry of dopamine receptors in the central nervous system and peripheral tissue." J Neural Transm Suppl **22**: 19-32.

Missale, C., S. R. Nash, et al. (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.

Moretao, M. P., A. R. Zampronio, et al. (2004). "Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco)." Immunol Lett **93**(2-3): 189-197.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Narumiya, S. (2009). "Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice." J Mol Med (Berl) **87**(10): 1015-1022.

Onodera, K., H. Shinoda, et al. (2000). "Antinociceptive effect induced by intraperitoneal administration of vitamin K2 (menatetrenone) in ICR mice." Life Sci **68**(1): 91-97.

Otuki, M. F., J. Ferreira, et al. (2005). "Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways." J Pharmacol Exp Ther **313**(1): 310-318.

Petho, G. and P. W. Reeh (2012). "Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors." Physiol Rev **92**(4): 1699-1775.

Quintao, N. L., R. Medeiros, et al. (2005). "The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice." Anesth Analg **101**(6): 1763-1769.

Riva, D., A. Barison, et al. (2012). "Chemical study of *Sinningia allagophylla* guided by antiproliferative activity assays." Quimica Nova **35**(5): 974-977.

Roth, J. and G. E. De Souza (2001). "Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation." Braz J Med Biol Res **34**(3): 301-314.

Rudaya, A. Y., A. A. Steiner, et al. (2005). "Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature." American Journal of Physiology **289**(5): R1244-1252.

Song, S. H., H. Y. Min, et al. (2009). "Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF-kappaB activity." Int Immunopharmacol **9**(3): 298-302.

Southall, M. D. and M. R. Vasko (2001). "Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons." J Biol Chem **276**(19): 16083-16091.

Stefanello, M., A. Cervi, et al. (2005). "Óleo essencial de *Sinningia aggregata*" Revista Brasileira de Farmacognosia **15**(4): 331-333.

Stochla, K. and S. Maslinski (1982). "Carrageenan-induced oedema in the rat paw - histamine participation." Agents Actions **12**(1-2): 201-202.

Swinny, E. E., S. J. Bloor, et al. (2000). "H-1 and C-13 NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside." Magnetic Resonance in Chemistry **38**(12): 1031-1033.

Tada, H., O. Shiho, et al. (1986). "An improved colorimetric assay for interleukin 2." J Immunol Methods **93**(2): 157-165.

Taiwo, Y. O. and J. D. Levine (1988). "Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradykinin and noradrenaline hyperalgesia." Brain Res **458**(2): 402-406.

Thomas, G. (1980). "Characteristics of prostaglandin E1 potentiation of inflammatory activity of some agents." Prostaglandins **19**(1): 39-50.

Verdan, M. H., A. Barison, et al. (2010). "Lactones and Quinones from the Tubers of *Sinningia aggregata*." Journal of Natural Products **73**(8): 1434-1437.

Verdan, M. H., A. C. Cervi, et al. (2009). "Anthraquinones and ethylcyclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* "Fyfiana"." Biochemical Systematics and Ecology **37**(1): 40-42.

Verri, W. A., Jr., T. M. Cunha, et al. (2006). "Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?" Pharmacol Ther **112**(1): 116-138.

Villarreal, C. F., M. I. Funez, et al. (2013). "The long-lasting sensitization of primary afferent nociceptors induced by inflammation involves prostanoid and dopaminergic systems in mice." Pharmacol Biochem Behav **103**(3): 678-683.

Villasenor, I. M., J. Angelada, et al. (2002). "Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside." Phytother Res **16**(5): 417-421.

Vranken, J. H. (2009). "Mechanisms and treatment of neuropathic pain." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **9**(1): 71-78.

Werner, U. and I. Szelenyi (1992). "Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues." Agents Actions Spec No: C101-103.

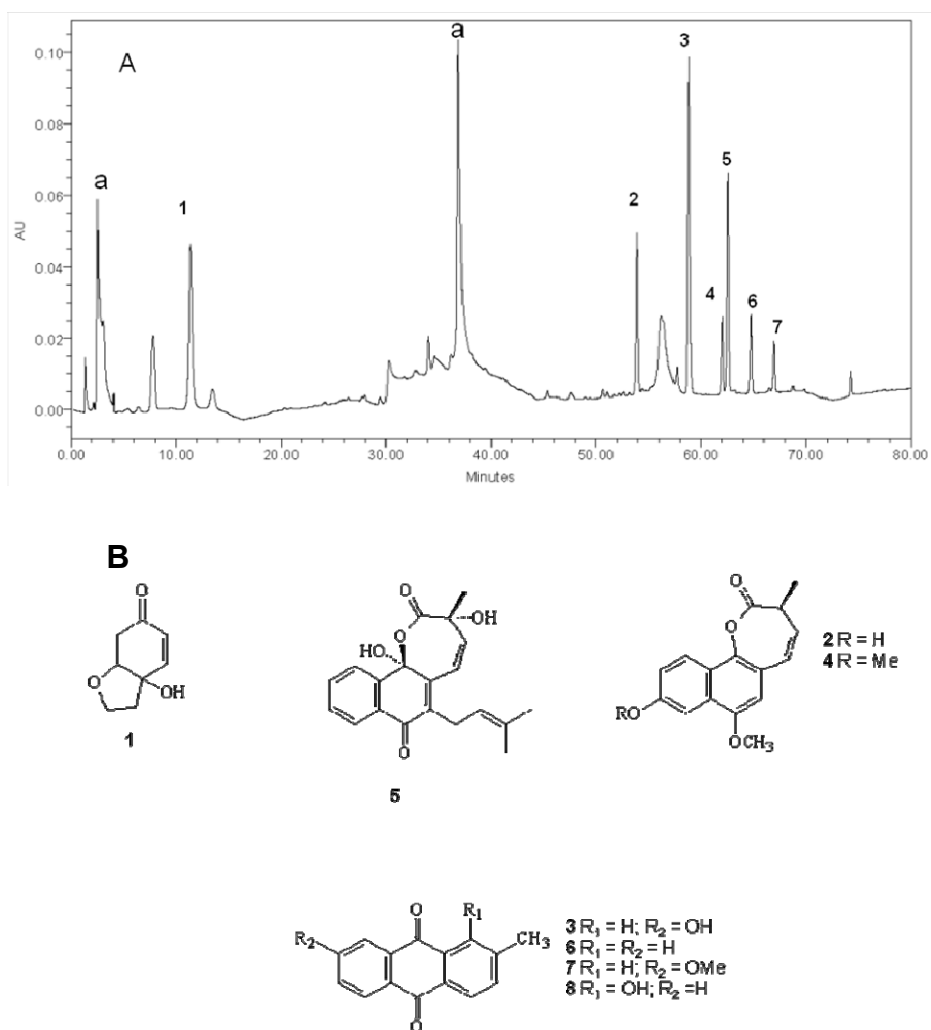
Young Casey, C., M. A. Greenberg, et al. (2008). "Transition from acute to chronic pain and disability: a model including cognitive, affective, and trauma factors." Pain **134**(1-2): 69-79.

Zakrzewska, J. M. (2010). "Medical management of trigeminal neuropathic pains." Expert Opin Pharmacother **11**(8): 1239-1254.



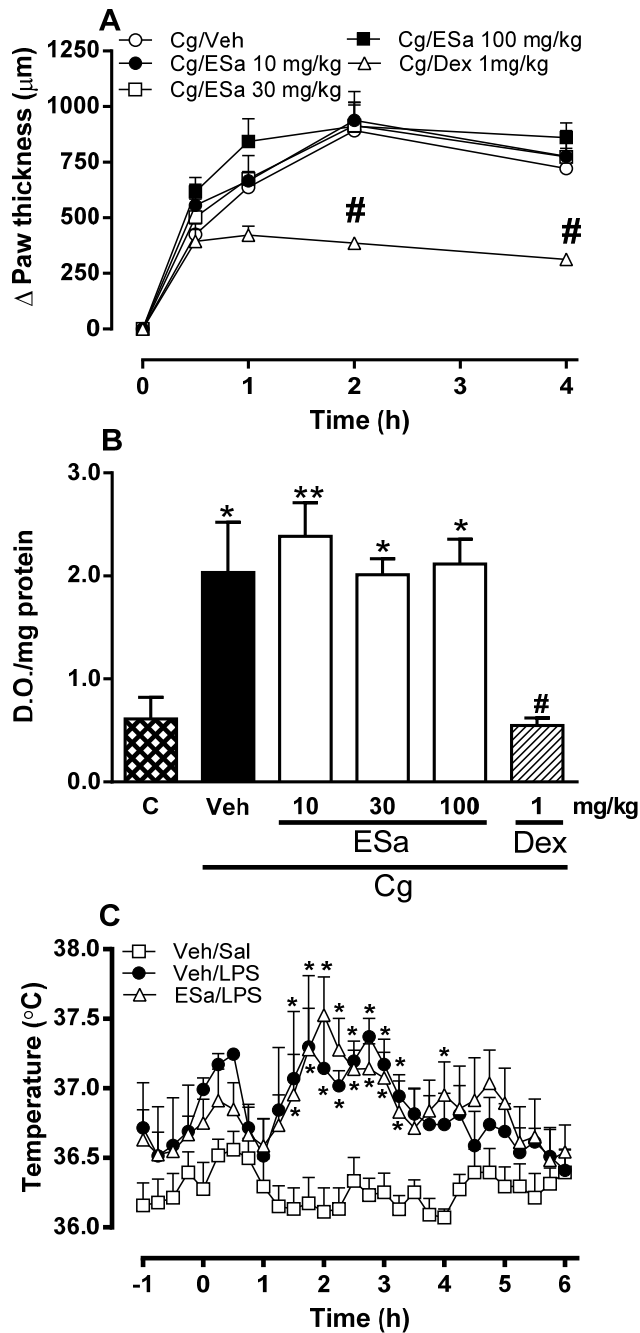
## FIGURES

Figure 1



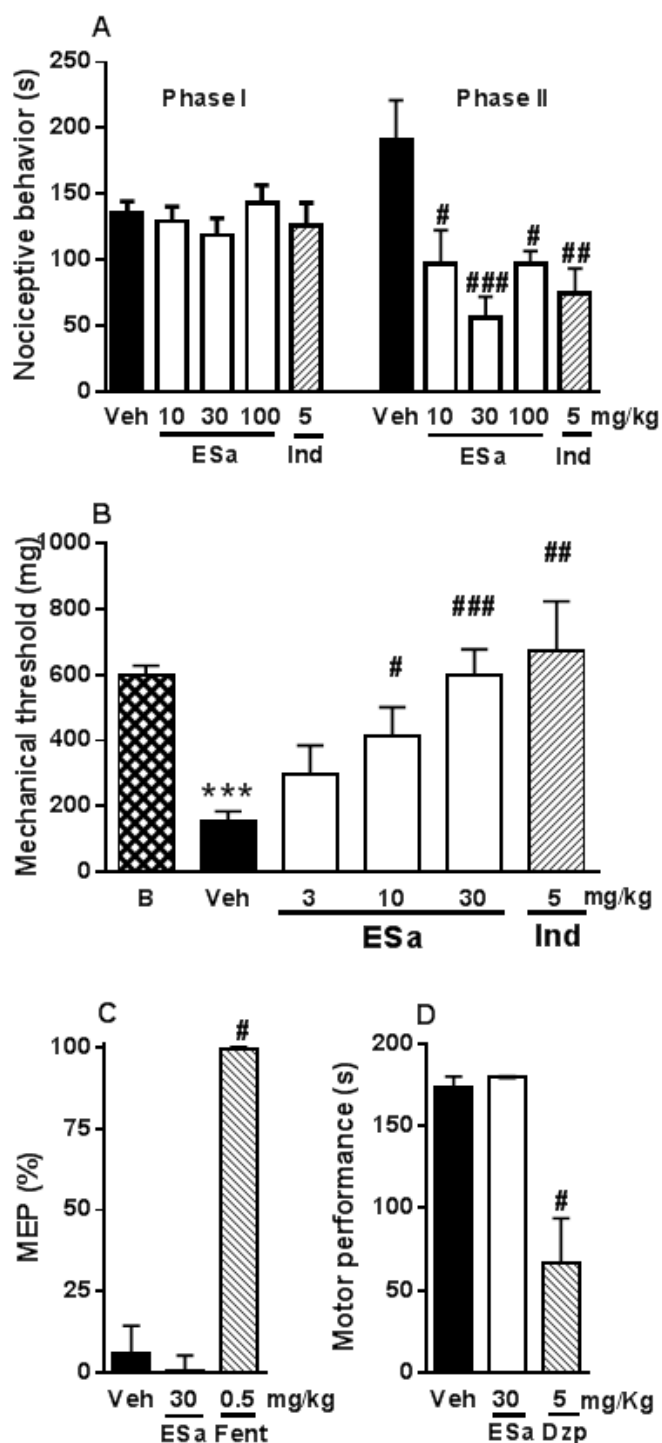
**Figure 1: Fingerprint of the ESa obtained from the tubers of *S. aggregata*.** The structures of the compounds identified are shown in panel B and are as follows: haleridone (1), aggregatin A (2), 7-hydroxytectoquinone (5), aggregatin C (4), aggregatin D (3), tectoquinone (6) and 7-methoxytectoquinone (7), 1-hydroxytectoquinone (8), unidentified glycoside (a).

Figure 2



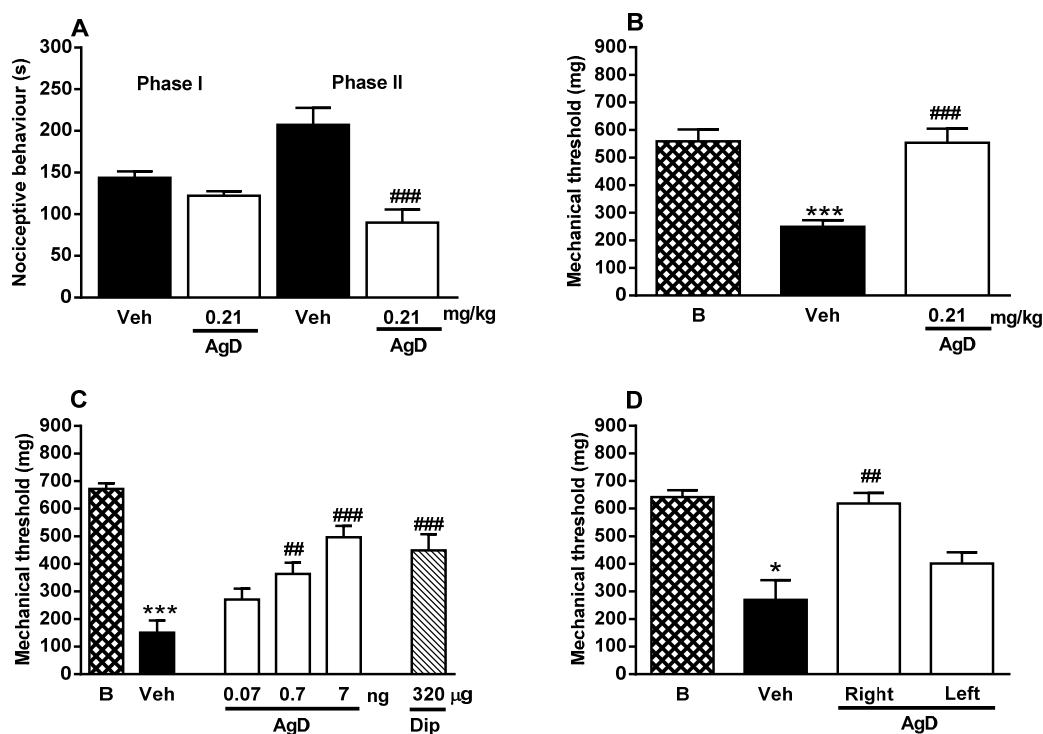
**Figure 2: Effect of ESa on carrageenan-induced edema and neutrophil migration and on lipopolysaccharide-induced fever.** Animals were treated with ethanolic extract from *S. aggregata* (ESa, 10 to 100 mg/kg, as indicated), Dexamethasone (Dex, 1 mg/kg), or the appropriate vehicles (Veh) by oral route. One hour after the oral treatment animals were injected with carrageenan (Cg, 300  $\mu\text{g}$ ) in the paw (panels A and B) or LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p., panel C). On panel B, the control (C) animals are non-injected animals. Data show the mean  $\pm$  s.e.mean of the change in the paw thickness ( $\mu\text{m}$ , panel A), optical density (D.O./mg protein, panel B) or body temperature ( $^{\circ}\text{C}$ , panel C) ( $n=7-14$ ). Symbols denote statistical difference in relation to the control (C) or Veh/Sal group (\*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ) or to Veh/Cg (# $p<0.05$ )

Figure 3



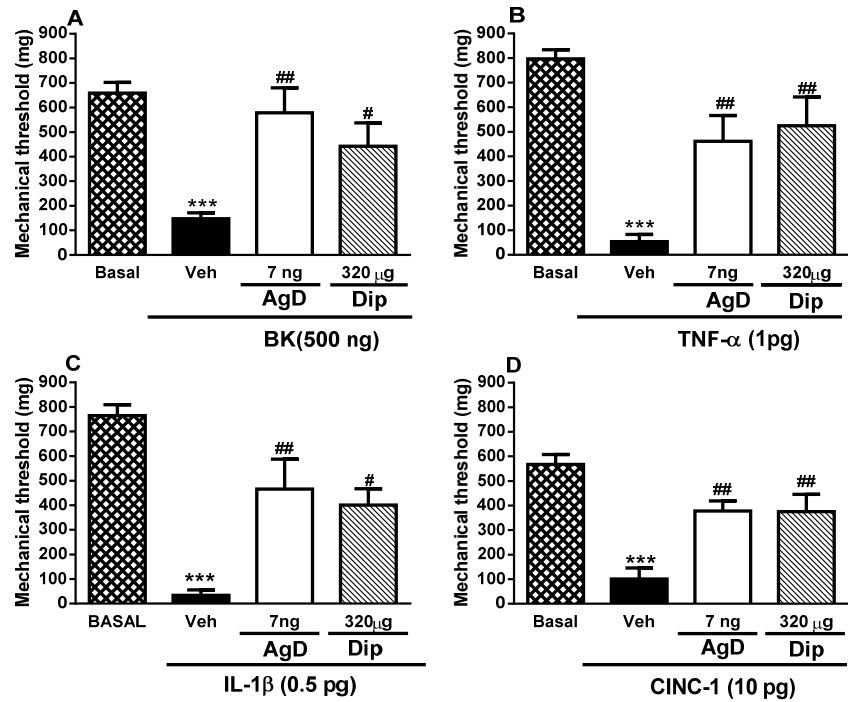
**Figure 3: Effect of ESa on nociception.** Animals were treated with ethanolic extract from *S. aggregata* (ESa, 10 to 100 mg/kg, as indicated), Indomethacin (Ind, 5 mg/kg) or Diazepam (Dzp, 5 mg/kg) by oral route or with Fentanyl (Fent, 0.5 mg/kg, s.c.) or the appropriate vehicles (Veh) as described in Methods. One hour after the oral treatment or 15 min after s.c. treatment, animals were injected with formalin 2.5% in the paw (panel A) or carrageenan (300  $\mu$ g) in the paw (panels B) or submitted to the hot plate (panel C) or rota-rod task (panel D). On panel B, basal (B) mechanical threshold means the threshold before any injection. Data show the mean  $\pm$  s.e.mean of the change in the nociceptive behavior (s, panel A), mechanical threshold (mg, panel B), MEP (%), panel C) and motor performance (s, panel D) (n=7-14). Symbols denote statistical difference in relation to the basal (B) group (\*\*p<0.001) or to Veh-treated animals (#p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001)

Figure 4



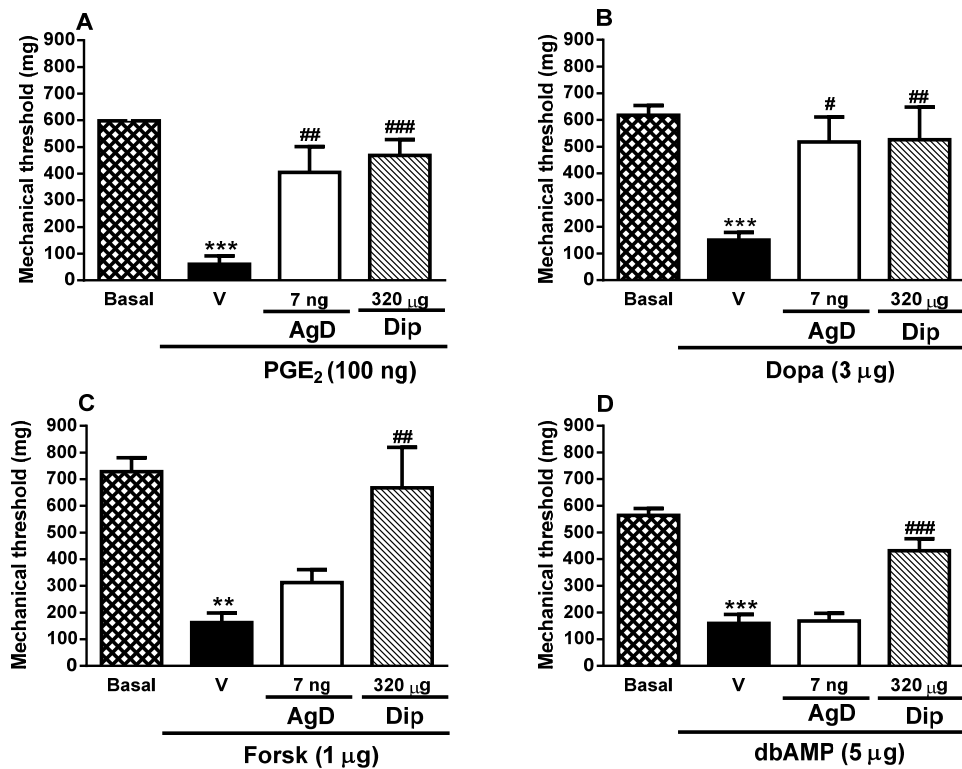
**Figure 4: Effect of AgD on nociceptive behavior induced by formalin and on mechanical hyperalgesia induced by carrageenan.** Animals were treated with Aggregatin D (AgD) 0.21 mg/kg or vehicle (Veh), p.o. 1 h before the administration of formalin (2.5%, panel A) or carrageenan (Cg, 300 µg, panel B) into the right paw or AgD (0.07, 0.7, 7 ng/paw), Dipyrone (Dip, 320 µg/paw) or vehicle (Veh) 15 min before the injection of Cg (panel C) into the right paw. On panel D, AgD (7ng/paw) was injected in right or left paw as indicated and Cg (300 µg) was injected in the right paw. Basal (B) threshold was evaluated before any injection in panels B, C and D. Formalin-induced nociceptive behavior was evaluated in phase I (0-5 min) or in phase II (15 to 30 min) and the mechanical threshold was evaluated again 3 h after the injection of Cg. Bars represent the mean±s.e.mean of the nociceptive behavior (s) induced by formalin in each phase or the mechanical threshold (n=10-20). Symbols denote statistical difference in relation to basal threshold (\* p<0.05, \*\*\*p<0.001) or to veh-treated group (## p<0.01, ### p<0.001).

Figure 5



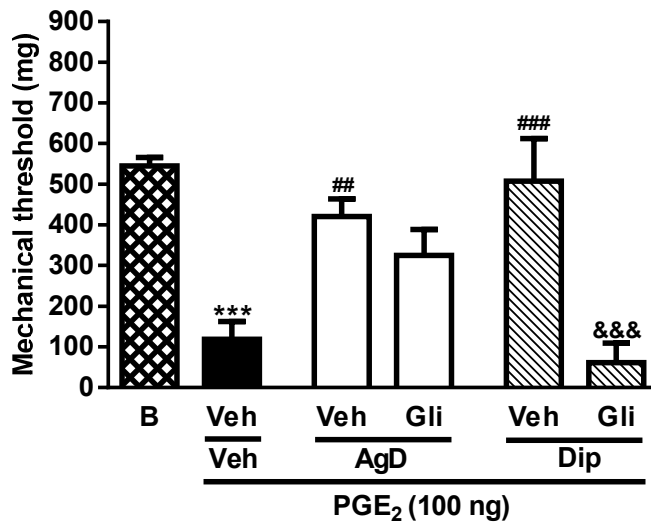
**Figure 5: Effect of AgD on mechanical hyperalgesia induced by BK and cytokines.** Animals were treated with Aggregatin D (AgD, 7 ng/paw), Dipyrone (Dip, 320 µg/paw) or vehicle (Veh) 15 min before the injection of bradykinin (BK, 500 ng/paw, panel A), tumor necrosis factor-α (TNF-α, 1 pg/paw, panel B), interleukin-1β (IL-1β, 0.5 pg/paw, panel C) or cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1, 10 pg/paw, panel D) in the right paw. Basal (B) threshold was evaluated before any injection. The mechanical threshold was evaluated again 3 h after the injection of the nociceptive stimuli. Bars represent the mean±s.e.mean of the mechanical threshold (mg, n=8-10). Symbols denote statistical difference in relation to basal threshold (\*\*\*p<0.001) or to veh-treated group (\*p<0.05, ##p<0.01).

Figure 6



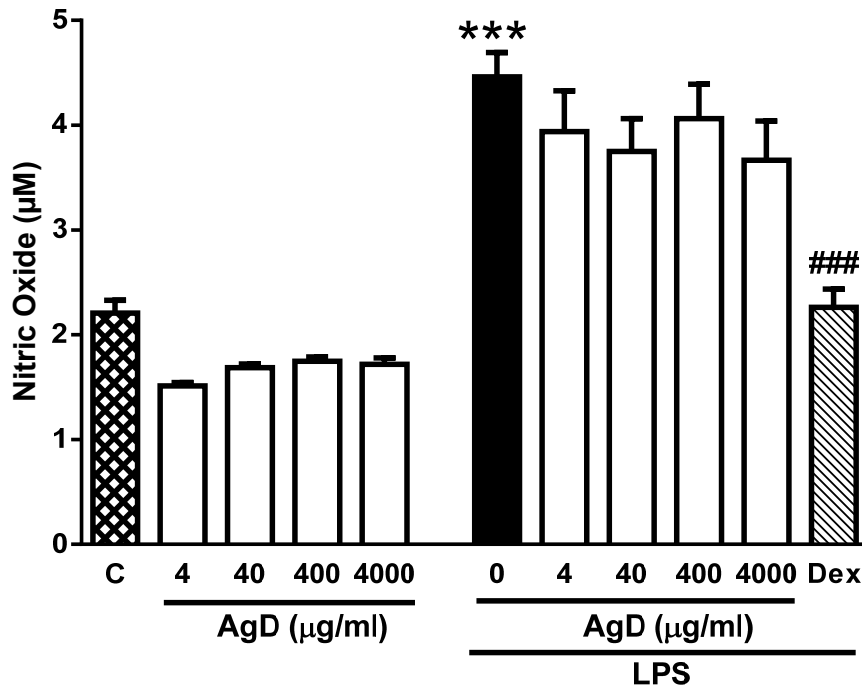
**Figure 6: Effect of AgD on mechanical hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub>, dopamine, forskolin and dbAMPc.** Animals were treated with Aggregatin D (AgD, 7 ng/paw), Dipyrone (Dip, 320 µg/paw) or vehicle (Veh) 15 min before the injection of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 100 ng/paw, panel A), Dopamine (Dopa, 3 µg/paw, panel B), forskolin (Forsk, 1 µg/paw, panel C) or dybutiryl cAMP (dbcAMP, 5 µg/paw, panel D) in the right paw. Basal (B) threshold was evaluated before any injection. The mechanical threshold was evaluated again 3 h after the injection of the nociceptive stimuli. Bars represent the mean±s.e.mean of the mechanical threshold (n=6-16). Symbols denote statistical difference in relation to basal threshold (\*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001) or to Veh-treated group (##p<0.01, ###p<0.001).

Figure 7



**Figure 7: Effect of the potassium channel blocker glibenclamide on the anti-hyperalgesic effect of AgD.** Animals were treated with the potassium channel blocker glibenclamide (Gli, 80  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) or the same volume of vehicle (Veh, Tween 80 1% in saline). After 30 min, animals received Aggregatin D (AgD, 7  $\text{ng}/\text{paw}$ ), Dipyrone (Dip, 320  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) or vehicle (Veh) followed by an injection of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 100  $\text{ng}/\text{paw}$ ) 15 min later. Basal (B) threshold was evaluated before any injection. The mechanical threshold was evaluated again 3 h after the injection of the nociceptive stimuli. Bars represent the mean  $\pm$  s.e. mean of the mechanical threshold (n=5-10). Symbols denote statistical difference in relation to basal threshold (\*\*\*p<0.001), to Veh/Veh-treated group (##p<0.01, ###p<0.001) or to the Veh/Dip-treated group (&&&p<0.001).

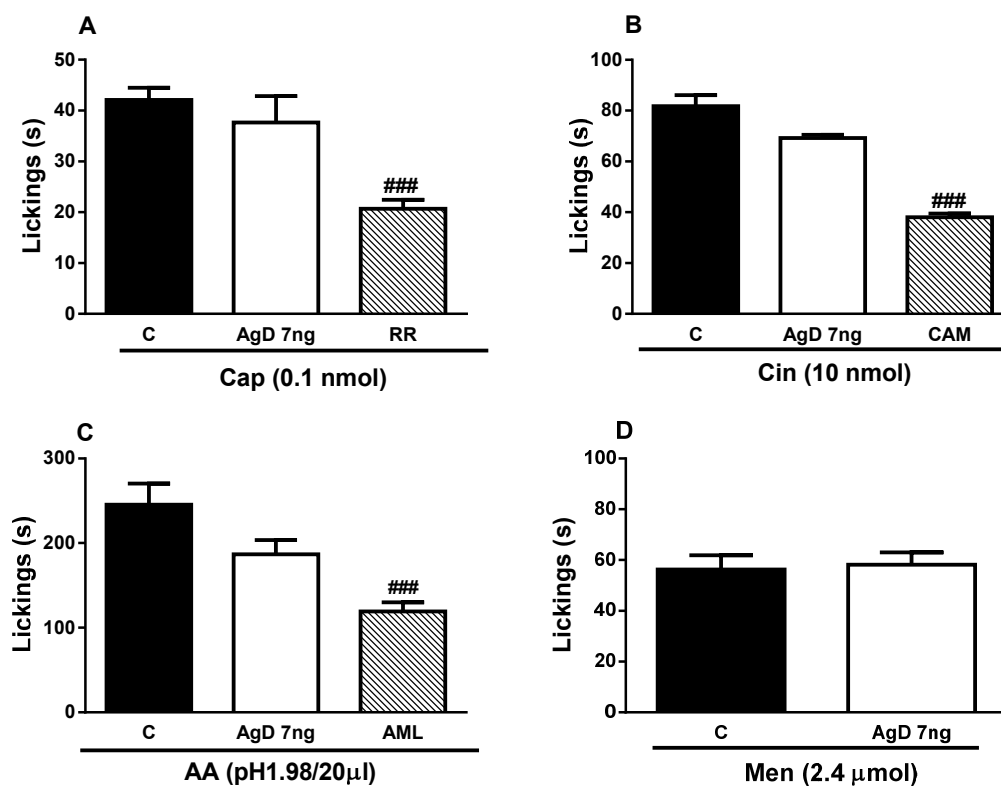
Figure 8



**Figure 8: Effect of AgD on NO release by peritoneal macrophages.** Mouse peritoneal macrophages ( $10^6$  cell/well) were treated with Aggregatin D (AgD, 4-4000 ng/ml) or with RPMI 1640 (control, C) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml). Positive control cells were treated with Dexamethasone (Dex, 9 µg/ml) in the presence of LPS. NO production was quantified through the Nitrite/nitrate production by the Griess method. Bars show the mean $\pm$ s.e.mean of the nitrite/nitrate ( $\mu$ M) in quadruplicates. Symbols denote statistical difference in relation to control (RPMI) group (\*\*\* $p$ <0.001) or to LPS-treated group (### $p$ <0.001).



Figure 9



**Figure 9: Effect of AgD on nociceptive behavior induced by capsaicin, cinnamaldehyde, acidified saline and menthol.** Animals were treated with AgD (7 ng/paw), ruthenium red (RR 1.5 µg/paw), camphor (CAM, 250 ng/paw) or amiloride (AML, 3 µg/paw) or vehicle (Veh) 10 min before the injection of capsaicin (0.1 nmol/paw, panel A), cinnamaldehyde (10 nmol/paw, panel B), acidified saline (pH1.98, 20 µl/paw, panel C) or menthol (2.4 µmol/paw, panel D) in the right paw. The nociceptive behavior was evaluated during 5 min in panels A and B and for 20 min in panels C and D. Bars represent the mean±s.e.mean of the nociceptive behavior (s) (n=5-8 animals). Symbols denote statistical difference in relation to Veh-treated group (###p<0.001).