

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO E DO ALCALOIDE S-(+)-DICENTRINA  
EXTRAÍDO DE FRUTOS DE *Ocotea puberula*  
(LAURACEAE)**

**TESE DE DOUTORADO**

**Deise Prehs Montrucchio**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO E DO ALCALOIDE S-(+)-DICENTRINA EXTRAÍDO  
DE FRUTOS DE *Ocotea puberula* (LAURACEAE)**

**Deise Prehs Montrucchio**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia.**

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

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

Montrucchio, Deise Prehs

Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcaloide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de *Ocotea puberula* (Lauraceae) / Deise Prehs Montrucchio.-2012.  
162 p.; 30cm

Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Dicentrina 2. Nocicepção 3. TRPA1 4. PKA I. Santos, Adair Roberto Soares dos II. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Deise Prehs Montrucchio. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação do autor.

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

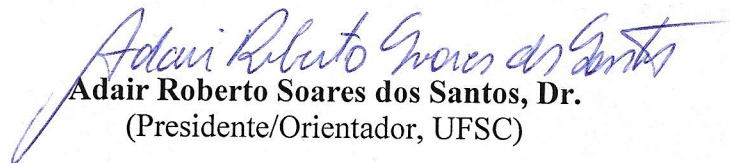
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado


**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO E DO  
ALCALOIDE S-(+)-DICENTRINA EXTRAÍDO DE FRUTOS DE  
*Ocotea puberula* (LAURACEAE)**

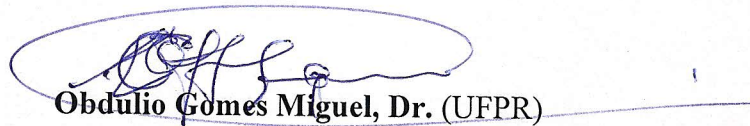
elaborada por  
**Deise Prehs Montrucchio**

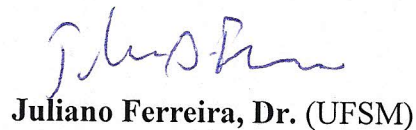
Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
**Adair Roberto Soares dos Santos, Dr.**  
(Presidente/Orientador, UFSC)

  
**Cristiane Hatsuko Baggio, Dr.<sup>a</sup> (UFPR)**

  
**Obdulio Gomes Miguel, Dr. (UFPR)**

  
**Juliano Ferreira, Dr. (UFSM)**

  
**Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 18 de dezembro de 2012.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dante e Evelina.

Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

Uma tese de doutorado, ninguém faz sozinho; uma trajetória acadêmica, ninguém traça sozinho; na vida, ninguém caminha sozinho. O que somos, o que pensamos e o que fazemos refletem, de certa forma, tudo aquilo que aprendemos com cada pessoa que passa pela nossa vida, com cada situação enfrentada, com cada desafio vencido. Esse trabalho foi um desafio. Um desafio vencido por mim, mas que leva também a assinatura de diversas pessoas que cruzaram o meu caminho ao longo dos anos. Com elas aprendi, ensinei, discuti ciência, falei bobagens, ri, chorei, me emocionei... e isso não tem preço!

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades que tive na vida, pelas pessoas e pelos desafios colocados no meu caminho, e por me abençoar com uma família unida, que sempre me deu o apoio necessário para traçar meu caminho. Agradeço aos meus pais, Dante e Evelina, que nunca mediram esforços para garantir o melhor às suas filhas, que nos educaram com bases sólidas, pautadas no amor, no respeito e na conduta ética. Agradeço às minhas irmãs, Denize e Eloisa, pelo apoio em todas as horas. E aos meus sobrinhos, Rafael, João Vitor, Mateus e Gustavo, que mesmo sem entender ao certo o porquê da “tia Deise” estar longe, sempre me presentearam com muita “festa” nas curtas idas para casa. Família, obrigada por tudo!

Agradeço ao professor Adair pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência e por acreditar nesse trabalho.

Agradeço também à UFPR e aos colegas do Departamento de Farmácia, pela oportunidade de me dedicar inteiramente às atividades do doutorado.

Aos amigos Obdulio e Marilis, Sandra e Pedro Zanin, fica meu agradecimento pela amizade e por toda a ajuda na parte fitoquímica desse trabalho. *Aquelas gomas todas deram meses e meses de trabalho, mas está aí o resultado...*

Ao Gabriel Araújo e Milena Kalegari, agradeço pela ajuda com os ensaios do HPLC.

Não poderia deixar de agradecer também ao Carlos Mello e Maribel Rubin, pela amizade e por todo o apoio durante o meu tempo de permanência em Santa Maria. Além do apoio à distância, na resolução de problemas técnicos.

Agradeço também aos demais professores, funcionários e colegas do PPG-Farmacologia da UFSM, e aos funcionários da fisiologia da UFSC, seu Carlos e dona Vilma. *As centenas de canecas de café tiveram sua importância.*

E os amigos? Ah, os amigos... peças fundamentais nessa trajetória! No início, apenas “colegas de curso”, “colegas de laboratório”. Com o tempo e a convivência, entre disciplinas, seminários, cafés, conversas e experimentos, logo vão aparecendo as afinidades e as diferenças; vamos aprendendo a lidar com as diferentes idéias e a respeitar as diferentes personalidades; surgem as discussões científicas na mesa do bar, e as conversas casuais nos intervalos do café (*ué, não devia ser ao contrário?*); surgem bordões, apelidos, discussões acaloradas, *happy hours*, festas, risadas (*óia as conversa...*); e surgem também as colaborações, os trabalhos em conjunto, o crescimento pessoal e profissional. E, de repente, nos damos conta de que aqueles “colegas” não existem mais. Eles se tornaram amigos, e daquele tipo mais valioso, que escolhemos como uma segunda família. Tive a sorte de encontrar alguns destes no meu caminho. Meu muito obrigada à Fran, Marina e Ana; aos *nênes*, Fabio e Josiel; ao Ney, Morgana, Débora, Fer Lapa e Tatiane. Valeu pela contribuição nos experimentos, pelas conversas descontraídas (que sempre renderam boas risadas), pelos desabafos, pelas festas, pela parceria, pela paciência (*às vezes mais, às vezes menos*)! Enfim, pelo apoio em todas as horas e, principalmente, pela amizade!!

Meu agradecimento também aos demais amigos e colegas da *Família Landi*, um grupo tão grande e tão diversificado, com quem aprendi muito mais do que farmacologia, nocicepção ou neurociências. Igor, Tátilla, Catharina, Murilo, Serginho, Ari, Daniel, Leidiane, Chico, Rafaela, Cirene, Bira, Wlad, Tay, Karol, obrigada pelas conversas, pela colaboração, pela companhia, pela união e pela ótima convivência.

Meu agradecimento especial também às amigas Daiane e Taís. Mais que isso, posso chamá-las de minhas “irmãs gaúchas”. Acho que isso diz tudo!

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO E DO ALCALOIDE S-(+)-DICENTRINA EXTRAÍDO DE FRUTOS DE *Ocotea puberula* (LAURACEAE)**

AUTORA: Deise Prehs Montrucchio  
ORIENTADOR: Adair Roberto Soares dos Santos  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de dezembro de 2012

A *Ocotea puberula* (Lauraceae) é uma árvore nativa brasileira, conhecida nos estados da região sul por canela guaicá ou canela amarela, cuja composição fitoquímica inclui diversos alcaloides do tipo aporfínicos, alguns dos quais com atividades biológicas já demonstradas. Frutos coletados na região de Curitiba, Paraná, foram submetidos a processos de extração e fracionamento, permitindo isolar um alcaloide identificado como *dicentrina*, presente como componente majoritário. Neste trabalho, foi investigado o potencial antinociceptivo das frações orgânicas obtidas a partir do extrato dos frutos de *O. puberula* e da dicentrina (DCTN) isolada da fração clorofórmica (FC). Tanto a FC quanto a DCTN, administradas por via oral, foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela formalina e pelo ácido acético, com  $DI_{50}$  semelhantes, sugerindo que o efeito de FC seja devido à presença da DCTN. As frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE), por sua vez, não apresentaram efeito antinociceptivo. A DCTN também apresentou efeito antinociceptivo em modelos crônicos, tanto inflamatório (injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund) quanto neuropático (ligadura parcial do nervo ciático), sendo capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e ao frio, porém sem alterar a resposta ao calor. Quando avaliada frente à ativação de termo-receptores, a DCTN administrada tanto por via sistêmica (via oral) quanto local (via intraplantar) reduziu a nocicepção induzida pelo cinamaldeído, um ativador de canais TRPA1, mas não alterou a resposta induzida pela capsaicina, um ativador de canais TRPV1. O efeito antinociceptivo da DCTN não foi revertido pelo pré-tratamento com antagonistas de receptores opióides, adrenérgicos ou canabinóides e nem pelo pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina, sugerindo que estes sistemas descendentes de controle da dor não estão envolvidos no mecanismo de ação da DCTN. Por outro lado, a DCTN foi capaz de prevenir a hipersensibilidade induzida pelos ativadores da via AMPc/PKA, forskolina e PGE2, e também foi capaz de reduzir a ativação da PKA, demonstrada por análise de *western blotting*, sugerindo que a DCTN possa agir por interação com essa via de sinalização. Por outro lado, a DCTN apresentou pouca ou nenhuma ação frente à hipersensibilidade mecânica induzida pela bradicinina ou pelo PMA, respectivamente, o que sugere que a via PLC/PKC não está envolvida no seu efeito antinociceptivo. A DCTN não causou efeitos sedativos, alteração motora ou alteração na temperatura corporal dos animais e, embora o tratamento diário durante 14 dias tenha aumentado o peso relativo do fígado, não foram observadas alterações nos níveis sanguíneos de AST, ALT ou  $\gamma$ -GT. Coletivamente, os dados deste trabalho demonstram que a DCTN apresenta um importante efeito antinociceptivo em modelos de dor agudos e crônicos, principalmente de cunho inflamatório, e seu mecanismo de ação parece envolver interação com canais TRPA1 e com a via de sinalização AMPc/PKA. Desta forma, a DCTN constitui-se como uma potencial candidata para a continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados, e futuramente clínicos, visando o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

Palavras-Chave: Alcaloide. Analgésico. Dor. PKA. TRPA1.



## ABSTRACT

PhD Thesis  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF THE EXTRACT AND THE ALKALOID S-(+)-DICENTRINE EXTRACTED FROM *Ocotea puberula* (LAURACEAE) FRUITS

AUTHOR: Deise Prehs Montrucchio  
ADVISER: Adair Roberto Soares dos Santos  
Date and Place of the Defense: Santa Maria, December 18<sup>th</sup>, 2012

*Ocotea puberula* (Lauraceae) is a Brazilian native tree, known in the South regions as *canela guaicá* or *canela amarela*. Its phytochemical composition includes several alkaloids of aporphinic type, some of them with biological activities already reported. Fruits collected in Curitiba, state of Paraná, were submitted to extraction and fractioning processes, allowing the isolation of an alkaloid identified as *dicentrine*, present as the majoritarian substance. In the present work we investigated the antinociceptive potential of the organic fractions obtained from *O. puberula* fruits extract and dicentrine (DCTN) isolated from the chloroform fraction (CF). Both CF and DCTN, given by oral route, were able to reduce the nociception induced by formalin and acetic acid with similar ID<sub>50</sub>, suggesting that the CF effect is due to the presence of DCTN. Hexanic (HF) or ethyl acetate (EAF) fractions had no antinociceptive effect. DCTN also presented antinociceptive effects in chronic models such as inflammatory (induced by intraplantar injection of Freund's complete adjuvant) and neuropathic (induced by partial sciatic nerve ligation), being able to reduce mechanical and cold hypersensitivity, with no changes in the response to heat. When evaluated against the thermo-receptors activation, DCTN administered either systemically (by oral route) or locally (by intraplantar route) reduced the nociception induced by cinnamaldehyde, a TRPA1 activator, but did not alter the response induced by capsaicin, a TRPV1 activator. The antinociceptive effect of DCTN was not affected by the pretreatment with antagonists of opioid, adrenergic or cannabinoid receptors, and neither by the pretreatment with an inhibitor of serotonin synthesis, suggesting that these descending mechanisms of pain control are not involved in the DCTN mechanism of action. On the other hand, DCTN was able to prevent the hypersensitivity induced by cAMP/PKA pathway activators, forskolin and PGE<sub>2</sub>, and it also reduced PKA activation, demonstrated by western blotting analysis, suggesting that DCTN may act by interaction with this signaling pathway. On the other hand, DCTN presented few or none action on the hypersensitivity induced by bradikinin or PMA, respectively, suggesting that the PLC/PKC pathway is not involved in DCTN antinociceptive action. Additionally, DCTN did not cause any sedative effect, neither alterations on motor activity or body temperature, and although daily treatment caused a slight increase in liver relative weight, alterations on AST, ALT or  $\gamma$ -GT levels were not observed. Together, these results demonstrate that DCTN has an important antinociceptive effect in acute and chronic models of pain, mainly of inflammatory origin, and its mechanism of action seems to involve an interaction with TRPA1 channels and the cAMP/PKA signaling pathway. In this way, DCTN may be considered a potential candidate to further pre-clinical and even clinical investigations for development of analgesic drugs.

Keywords: Alkaloid. Analgesic. Pain. PKA. TRPA1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias .....	21
Figura 2 – Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal .....	23
Figura 3 – Representação esquemática das vias ascendentes e descendentes da informação nociceptiva .....	24
Figura 4 – Principais <i>thermo-TRPs</i> envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores .....	32
Figura 5 – Frutos de <i>Ocotea puberula</i> .....	38
Figura 6 – Estrutura química dos alcaloides aporfínicos .....	40
Figura 7 – Perfil cromatográfico por CLAE da fração FC e da dicentrina isolada a partir da fração FC .....	63
Figura 8 – Curva de concentração da dicentrina e doseamento na fração FC..	64
Figura 9 – Efeito da fração FC na nocicepção induzida por formalina .....	65
Figura 10 – Efeito da fração FC e DCTN na nocicepção induzida por ácido acético .....	66
Figura 11 – Envolvimento dos sistemas opióide e adenosinérgico .....	67
Figura 12 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 50% .....	69
Figura 13 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 80% .....	70
Figura 14 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade térmica induzida por CFA 80% .....	71
Figura 15 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por capsaicina .....	72
Figura 16 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por cinamaldeído .....	73
Figura 17 – Efeito da DCTN na nocicepção espontânea e térmica ao frio induzida por cinamaldeído – curva dose-resposta .....	74

Figura 18 – Efeito da DCTN administrada por via oral na nocicepção induzida por formalina .....	75
Figura 19 – Efeito da DCTN administrada por via intraplantar e intratecal na nocicepção induzida por formalina .....	76
Figura 20 – Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da DCTN	77
Figura 21 – Envolvimento do sistema adrenérgico no efeito antinociceptivo da DCTN .....	78
Figura 22 – Envolvimento do sistema canabinóide no efeito antinociceptivo da DCTN .....	79
Figura 23 – Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da DCTN .....	80
Figura 24 – Efeito da DCTN na hiperalgesia induzida por BK, PMA, FSK e PGE <sub>2</sub> .....	81
Figura 25 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por FSK .....	82
Figura 26 – Efeito da DCTN na ativação da PKA .....	83
Figura 27 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC .....	84
Figura 28 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade ao frio induzida pela LPNC ...	85
Figura 29 – Efeito da DCTN na potencialização da sedação induzida por cetamina .....	86
Figura 30 – Efeito da administração diária de DCTN no peso relativo de órgãos vitais .....	87
Figura 31 – Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da dicentrina .....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Curva de concentração da dicentrina por CLAE e quantificação na fração clorofórmica .....	63
Tabela 2 – Efeitos das frações FH e FAE na nocicepção induzida por formalina em camundongos .....	65
Tabela 3 – Efeito da administração diária de veículo ou DCTN, durante 14 dias, nos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>15d-PGJ2</b>	15-deoxi-prostaglandina J2
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não esteroidal
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>ASIC</b>	Canal iônico sensível a ácido
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CDME</b>	Corno dorsal da medula espinal
<b>CEUA</b>	Comitê de ética para o uso de animais
<b>CFA</b>	Adjuvante completo de Freund
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>CHA</b>	N <sup>6</sup> – ciclohexil adenosina
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DCTN</b>	Dicentrina
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dose efetiva 50%
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose inibitória 50%
<b>EP</b>	Receptor prostanóide E
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>FAE</b>	Fração acetato de etila obtida a partir dos frutos de <i>O. puberula</i>
<b>FC</b>	Fração clorofórmica obtida a partir dos frutos de <i>O. puberula</i>
<b>FH</b>	Fração hexânica obtida a partir dos frutos de <i>O. puberula</i>
<b>FSK</b>	Forscolina
<b>GDNF</b>	Fator neurotrófico derivado da glia
<b>GJ</b>	Gânglio jugular
<b>GN</b>	Gânglio nodoso
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G

<b>GRD</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>GT</b>	Gânglio trigeminal
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	Via intraplantar
<b>IASP</b>	Associação Internacional para Estudo da Dor
<b>LPNC</b>	Ligadura parcial do nervo ciático
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>NGF</b>	Fator de crescimento do nervo
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>PAG</b>	Substância cinzenta periaquedutal
<b>PAR-2</b>	Receptores ativados por protease do tipo 2
<b>PCPA</b>	p-cloro fenilalanina metil éster
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteína cinase A
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PMA</b>	Acetato miristato de forbol
<b>p-PKA</b>	Fosfo-PKA (PKA fosforilada)
<b>RES</b>	Fração residual alcoólica obtida a partir dos frutos de <i>O. puberula</i>
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RTK</b>	Receptor de tirosina cinase
<b>RVM</b>	Bulbo rostroventral
<b>s.c.</b>	Via subcutânea
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>TBS-T</b>	Tampão tris-salina contendo tween 20
<b>TRP</b>	Canal iônico de potencial transitório
<b>TRPA</b>	Canal iônico de potencial transitório subfamília anquirina
<b>TRPM</b>	Canal iônico de potencial transitório subfamília melastatina
<b>TRPV</b>	Canal iônico de potencial transitório subfamília vanilóide
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>γ-GT</b>	Gama-glutamil transferase

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of <i>Ocotea puberula</i> - artigo publicado no periódico Planta Medica.....	128
Anexo 2 – Antinociceptive effect of dicentrine: evidence for a role of TRPA1 channels – manuscrito submetido para publicação .....	139

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. O Processamento Nociceptivo .....	19
1.2. A Dor De Origem Inflamatória .....	25
1.3. A Dor Neuropática .....	28
1.4. O Papel Dos Receptores De Potencial Transitório – TRPs .....	30
1.4.1. Canais TRPV1 .....	31
1.4.2. Canais TRPA1 .....	33
1.4.3. TRPV1, TRPA1 e a Hipersensibilidade .....	34
1.5. As Plantas Medicinais Como Fontes De Fármacos .....	35
1.6. Considerações Sobre O Gênero <i>Ocotea</i> .....	36
1.6.1. <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees .....	37
1.6.2. Alcaloides Aporfínicos e a Dicentrina .....	39
1.7. Justificativa .....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
2.1. Objetivo Geral .....	44
2.2. Objetivos Específicos .....	44
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1. Material Botânico .....	45
3.1.1. Extração, Fracionamento, Isolamento e Identificação .....	45
3.2. Animais .....	47
3.3. Metodologias Utilizadas no Artigo 1 - Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated From Fruits of <i>Ocotea puberula</i> .....	47
3.3.1. Nocicepção Induzida por Formalina .....	47
3.3.2. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético .....	48
3.3.3. Avaliação do Possível Envolvimento do Sistema Opióide .....	48
3.3.4. Avaliação do Possível Envolvimento do Sistema Adenosinérgico .....	49
3.3.5. Avaliação da Atividade Locomotora .....	49
3.4. Metodologias Utilizadas no Artigo 2 – Antinociceptive Effect of Dicentrine: Evidence for a Role of TRPA1 Channels .....	50
3.4.1. Nocicepção Inflamatória Crônica Induzida por Adjuvante Completo de Freund .....	50
3.4.1.1. Avaliação da hipersensibilidade mecânica .....	50



3.4.1.2. Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor .....	51
3.4.1.3. Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio .....	51
3.4.2. Nociceção Induzida por Capsaicina .....	51
3.4.3. Nociceção Induzida por Cinamaldeído .....	52
<b>3.5. Metodologias Utilizadas em Experimentos Adicionais .....</b>	<b>53</b>
3.5.1. Avaliação dos Efeitos Centrais e Periféricos da Dicentrina no Modelo da Formalina .....	53
3.5.2. Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito da Dicentrina.	54
3.5.2.1. Avaliação da participação dos sistemas endógenos de controle descendente da dor .....	54
3.5.2.1.1. Sistema opióide .....	54
3.5.2.1.2. Sistema adrenérgico .....	54
3.5.2.1.3. Sistema serotoninérgico .....	55
3.5.2.1.4. Sistema canabinóide .....	55
3.5.2.2. Avaliação da participação das vias de proteínas cinases .....	56
3.5.2.2.1. Hiperálgia induzida por bradicinina, acetato miristato de forbol, forskolina e prostaglandina E <sub>2</sub> .....	56
3.5.2.2.2. Avaliação do envolvimento da proteína cinase A (PKA) .....	56
a) <i>Nociceção induzida por forskolina</i> .....	56
b) <i>Preparação dos homogenatos</i> .....	57
c) <i>Ensaio de western blotting</i> .....	57
5.5.3. Nociceção Neuropática Induzida por Ligadura Parcial do Nervo Ciático.	58
3.5.4. Avaliação de Possíveis Efeitos Inespecíficos .....	59
3.5.4.1. Avaliação da atividade locomotora e temperatura corporal .....	59
3.5.4.2. Avaliação do possível efeito sedativo .....	59
3.5.4.3. Avaliação de possíveis efeitos tóxicos: ganho/perda de peso, peso relativo de órgão, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica .....	60
<b>3.6. Drogas e Reagentes .....</b>	<b>60</b>
<b>3.7. Análises Estatísticas .....</b>	<b>61</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. Resultados Apresentados No Artigo 1 - Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated From Fruits of <i>Ocotea puberula</i> .....</b>	<b>62</b>
4.1.1. Identificação e Doseamento da Dicentrina .....	62
4.1.2. Nociceção Induzida por Formalina .....	64
4.1.3. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético .....	66
4.1.4. Envolvimento dos Sistemas Opióide e Adenosinérgico .....	67

4.1.5. Atividade Locomotora .....	67
<b>4.2. Resultados Apresentados no Artigo 2 – Antinociceptive Effect of Dicentrine: Evidence for a Role of TRPA1 Channels .....</b>	<b>68</b>
4.2.1. Hipersensibilidade Mecânica Induzida por CFA .....	68
4.2.2. Hipersensibilidade Térmica Induzida por CFA .....	71
4.2.3. Nocicepção Induzida por Capsaicina e Cinamaldeído .....	71
<b>4.3. Resultados Apresentados nos Experimentos Adicionais .....</b>	<b>75</b>
4.3.1. Efeitos Centrais e Periféricos da Dicentrina no Modelo da Formalina .....	75
4.3.2. Envolvimento dos Sistemas Opióide, Adrenérgico, Canabinóide e Serotonérgico .....	77
4.3.3. Hiperalgesia Induzida por BK, PMA, FSK e PGE <sub>2</sub> .....	80
4.3.4. Envolvimento da Proteína Cinase A (PKA) .....	81
4.3.4.1. Nocicepção induzida por forskolina .....	81
4.3.4.2. Ensaios de <i>western blotting</i> .....	82
4.3.5. Nocicepção Neuropática Induzida por Ligadura Parcial do Nervo Ciático .....	83
4.3.6. Efeitos Inespecíficos – Atividade Locomotora, Temperatura Corporal, Efeito Sedativo e Efeitos Tóxicos .....	85
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>139</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As sensações de dor desempenham papel fundamental na proteção dos tecidos contra lesões. Sua percepção é de extrema importância para a sobrevivência e bem-estar, estando diretamente relacionada ao comportamento de proteção frente a um perigo real ou iminente de lesão. No entanto, em certas condições patológicas, os mecanismos relacionados à transmissão da dor podem ser alterados levando a quadros de hipersensibilidade onde, de uma função de alerta, a dor passa a ter um caráter crônico e muitas vezes debilitante (BASBAUM et al., 2009).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e TREEDE, 2008). Conforme tal descrição, a dor representa uma experiência complexa e muitas vezes subjetiva, envolvendo dois componentes distintos; o componente emocional refere-se às expectativas e/ou experiências prévias do indivíduo, enquanto o componente sensorial, denominado *nocicepção*, é determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (RUSSO e BROSE, 1998).

A dor pode ser classificada de acordo com dois critérios: a origem e a duração. Quanto à duração, a dor pode ser considerada *aguda*, decorrente de ativação direta de nociceptores (receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos) após um estímulo nocivo, ou *crônica*, quando persiste por semanas ou meses, muitas vezes permanecendo mesmo após a recuperação da lesão inicial (LOESER e MELZACK, 1999). Com relação à origem, a dor pode ser classificada como *nociceptiva*, ocorrendo por ativação direta e/ou excessiva de nociceptores ou *neuropática*, que ocorre como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afete o sistema somatosensorial, seja em nível periférico ou central. Há ainda a dor de origem *inflamatória*, sustentada pela sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios. As dores crônicas, de origem neuropática ou inflamatória, levam a situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente a um estímulo nocivo, ou alodinia, caracterizada pela

sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos não nocivos (MILLAN, 1999; DRAY, 1995; LOESER e TREEDE, 2008).

Por sua definição, a dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução do estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS e BASBAUM, 2001). Em outras palavras, a percepção da dor envolve o componente sensorial – a *nocicepção* – determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias e transmissão do impulso nociceptivo até o sistema nervoso central, e os componentes emocionais – afetivos, culturais e psicológicos. Desta forma, o termo *dor* é apropriado quando relacionado aos seres humanos, que são capazes de expressar tais componentes emocionais. Em modelos experimentais com roedores, a dor sentida pelos animais também envolve diversos aspectos, e embora vários trabalhos venham demonstrando metodologias para avaliação desse componente “emocional” em animais, os modelos clássicos de investigação de dor permitem avaliar com relativa precisão e reprodutibilidade apenas o seu componente sensorial. Desta forma, nestes modelos considera-se mais apropriado utilizar o termo *nocicepção* (BARROT, 2012).

### 1.1. O Processamento Nociceptivo

Desde a antiguidade as idéias relacionadas à dor foram bastante diversificadas. Na Grécia antiga, foi Aristóteles (384-322 a.C.) quem teve o impacto mais significativo no futuro entendimento sobre as sensações. Aristóteles entendia o tato como sendo um dos cinco sentidos principais, junto com a visão, olfato, audição e paladar, e acreditava que o tato estava diretamente relacionado à sensação de dor, reconhecendo sua direta correlação com um dano tecidual. Seguindo essa linha, Herophilus (335-280 a.C.) propunha ser o cérebro o órgão responsável pela consciência e sensações, reconhecendo que nervos periféricos seriam a ligação com a medula espinal, controlando as sensações e os movimentos, idéia que foi mais tarde confirmada por Galeno (130-201) (KEELE, 1957<sup>1</sup> apud PERL, 2011). No entanto foi Avicenna (980-1037), filósofo e fisiologista persa, quem relatou que em

---

<sup>1</sup> Keele, K.D., 1957. Anatomies of Pain. Charles C Thomas, Springfield, IL.

condições de doença, a dor poderia ser dissociada do reconhecimento do tato e temperatura, propondo então que a dor seria uma sensação independente (PERL, 2007).

A partir dos anos 1800, muitas teorias a respeito do processamento da dor foram propostas. Charles Bell, em 1811, formulou a idéia de que os nervos sensoriais eram especializados em sua função, ou seja, adaptados para detectar e transmitir a informação gerada por um determinado estímulo. Vários outros fisiologistas estenderam os conhecimentos da época, e por volta dos anos 1880, várias propostas já suportavam o papel essencial de um mecanismo espinal de condução da informação gerada por um estímulo doloroso. O modo de detecção desse estímulo nocivo, no entanto, foi proposto por Charles Sherrington em 1906, como sendo devido a estruturas sensoriais específicas, mais tarde denominadas nociceptores (PERL, 2007). A partir daí inicia-se uma intensa busca pelo entendimento dos processos envolvidos na transdução, transmissão e percepção da dor, sendo relatados inúmeros estudos que culminam com os conhecimentos atuais.

De acordo com a proposta de Sherrington<sup>2</sup>, os nociceptores compreendem as terminações nervosas de neurônios sensoriais primários, que podem ser ativados por estímulos capazes de causar dano tecidual (JULIUS e BASBAUM, 2001); de acordo com a definição da IASP, os nociceptores são “receptores sensoriais capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos” (LOESER e TREEDE, 2008). De fato, atualmente já está bem estabelecido o conceito de que existem neurônios sensoriais primários que podem ser estimulados por frio ou calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes, mas não por estímulos inócuos como o tato ou calor não-nocivo (JULIUS e BASBAUM, 2001). Essa diferença no padrão de ativação leva, portanto, ao conceito de que existem diferentes tipos de fibras sensoriais, responsáveis por diferentes padrões de transmissão do estímulo nociceptivo, cujas terminações não apresentam uma localização anatômica única, mas ao contrário, são distribuídas por todo o organismo, inervando a pele, músculos, articulações e vísceras.

As fibras sensoriais somáticas são provenientes de corpos celulares localizados no gânglio trigeminal (GT) ou no gânglio da raiz dorsal (GRD), inervando a região da cabeça ou do corpo, respectivamente (BASBAUM et al., 2009). Já as

---

<sup>2</sup> Sherrington, C.S., 1906. *The Integrative Action of the Nervous System*. Scribner, New York.

fibras aferentes vagais, que inervam a maioria dos tecidos viscerais, possuem seus corpos celulares nos gânglios nodoso (GN) e jugular (GJ) (BLACKSHAW et al., 2010). As fibras sensoriais possuem tanto um ramo axonal periférico, inervando tecidos periféricos, quanto um ramo axonal central, fazendo a conexão com a medula espinal (BASBAUM et al., 2009), e são classificadas em três grupos, com base em critérios anatômicos e funcionais (Figura 1). As fibras do tipo A $\alpha$  e A $\beta$ , mielinizadas e de maior diâmetro, são responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos inócuos, estando relacionadas ao tato e propriocepção, enquanto as fibras do tipo A $\delta$  e C estão relacionadas à detecção de estímulos nocivos e à nocicepção.

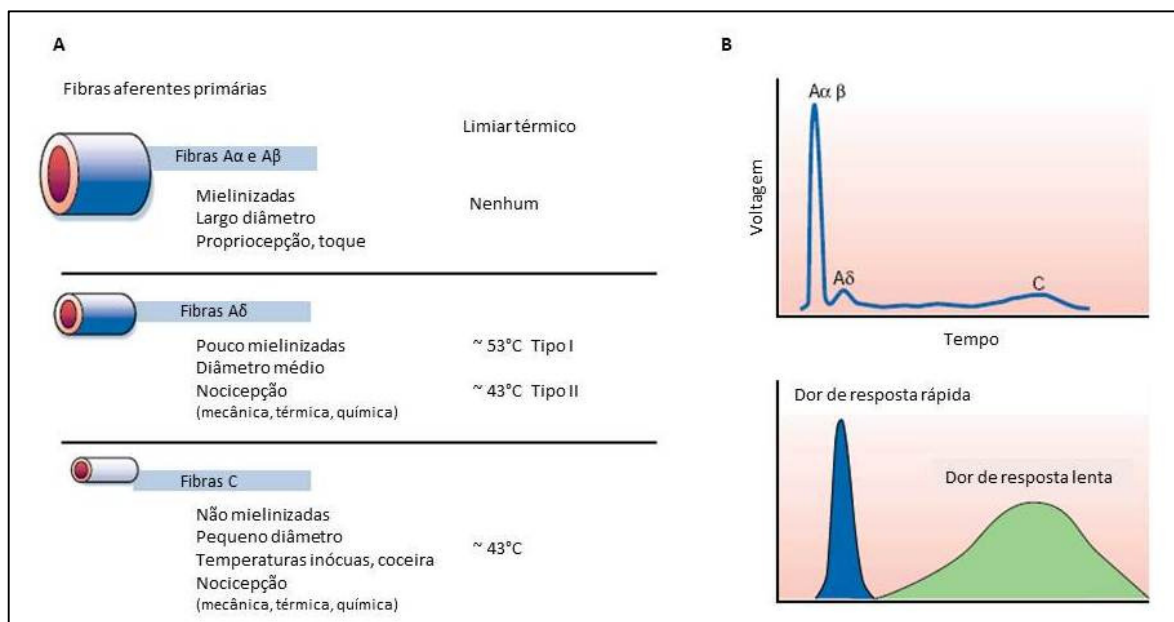


Figura 1 – Representação esquemática das diferenças anatômicas e funcionais das fibras sensoriais aferentes primárias

Diferentes tipos de fibras sensoriais detectam diferentes tipos de estímulos. Enquanto as fibras mielinizadas e de maior diâmetro (fibras A $\alpha$  e A $\beta$ ) são responsáveis pela detecção de estímulos não nocivos, as fibras de menor diâmetro, pouco ou não mielinizadas (fibras A $\delta$  e C, respectivamente) são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (painel A). A velocidade de condução está relacionada ao diâmetro da fibra (painel B), sendo as fibras do tipo A $\delta$  responsáveis pela resposta rápida (*first pain*) e as fibras do tipo C responsáveis pela resposta lenta (*second pain*). Fonte: Adaptado de JULIUS e BASBAUM, 2001.

As fibras A $\delta$  possuem diâmetro médio, são mielinizadas e responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos, térmicos e químicos associados à dor aguda. São ainda subdivididas em Tipo I, as quais respondem tanto a estímulos químicos quanto

mecânicos, com limiar de ativação térmico elevado ( $>50^{\circ}\text{C}$ ), e Tipo II, as quais apresentam menor limiar de ativação térmico ( $<43^{\circ}\text{C}$ ), porém elevado limiar de ativação mecânica. Já as fibras do tipo C, de pequeno diâmetro e não mielinizadas, também são polimodais, ou seja, respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, porém apresentam uma menor velocidade de condução e estão associadas à dor secundária, lenta e difusa, geralmente associada a quadros de nocicepção crônica (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009). Além da diferenciação anatômica, estas fibras também diferem na expressão de receptores seletivos e canais iônicos, o que confere certa especificidade dos nociceptores a determinados estímulos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias (ou neurônios aferentes primários) projetam-se ao corno dorsal da medula espinal (CDME) de maneira específica e organizada. O CDME possui uma organização laminar, sendo que cada lâmina é distinta anatômica e funcionalmente. As fibras nociceptivas ( $A\delta$  e C) inserem-se nas camadas mais superficiais (lâminas I e II) ou no caso das fibras  $A\delta$ , também na lâmina V, enquanto as fibras responsáveis primariamente pelo tato e propriocepção (fibras  $A\beta$ ) inserem-se nas lâminas III – V, mais profundas (Figura 2) (BASBAUM et al., 2009). A parte mais interna da lâmina II, onde se inserem as fibras C não-peptidérgicas, é caracterizada pela presença de interneurônios excitatórios que expressam a isoforma *gamma* da proteína cinase C (PKC), envolvida na dor persistente induzida por lesões (MALMBERG et al., 1997). Corroborando com essa divisão anatômica, estudos eletrofisiológicos demonstram que os neurônios espinais localizados nas lâminas I e II geralmente são responsivos a estímulos nocivos (via fibras  $A\delta$  e C), enquanto neurônios localizados nas lâminas III e IV são primariamente responsivos a estímulos inócuos (via fibras  $A\beta$ ). Já os neurônios localizados na lâmina V recebem tanto estímulos inócuos quanto estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009).

O CDME funciona como uma estação de controle da transmissão nociceptiva. Nesta região, os neurônios sensoriais primários liberam mediadores como glutamato e substância P, transmitindo o sinal nociceptivo a neurônios de segunda ordem (ou neurônios sensoriais secundários), que por sua vez formam vias ascendentes que transmitem a informação a centros supraespinais, como o tálamo e córtex, ocorrendo a interpretação e localização da dor (MILLAN, 2002). A Figura 3 representa as principais vias ascendentes da informação nociceptiva: pela via

espinotalâmica, o sinal nociceptivo é transmitido ao córtex somatosensorial através do tálamo, onde ocorre a percepção da localização e intensidade do estímulo nocivo; pela via espinoparabraquial, a informação é transmitida ao córtex insular e cingulado, através da amígdala, contribuindo para o componente emocional da percepção da dor (BASBAUM et al., 2009).

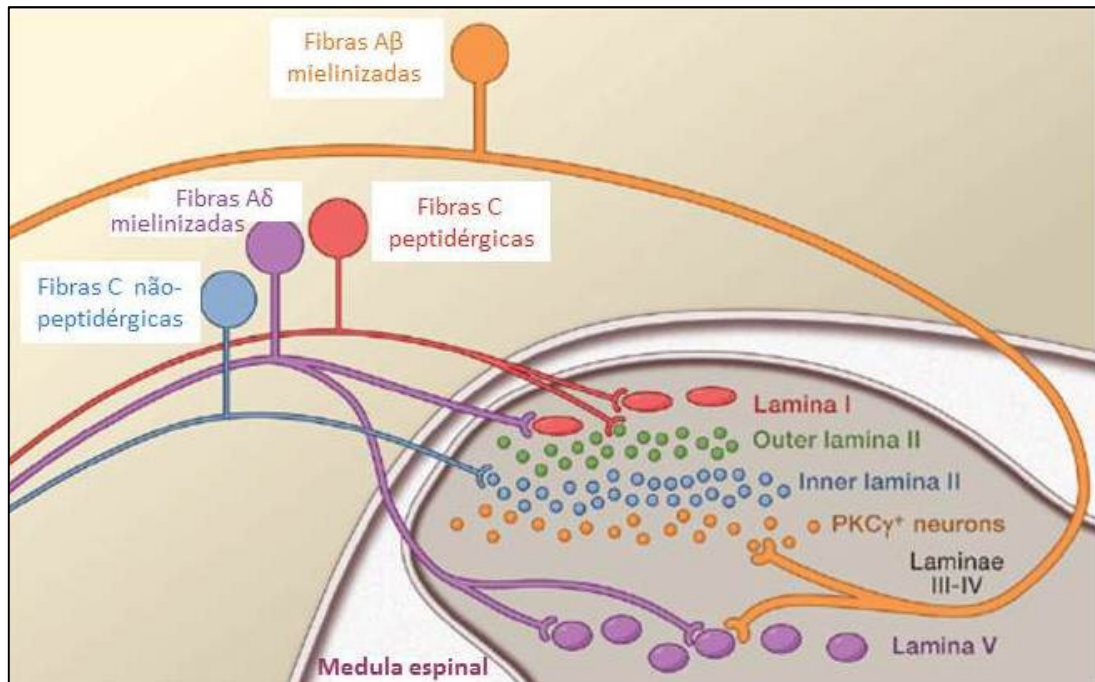


Figura 2 – Representação esquemática da inserção das fibras sensoriais aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal

Organização laminar do corno dorsal da medula espinal. Fibras nociceptivas C e A $\delta$  terminam mais superficialmente (lâminas I e II), onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem, sendo que as fibras A $\delta$  também se projetam para a lâmina V. As fibras não-nociceptivas (fibras A $\beta$ ) projetam-se para as camadas intermediárias, representadas pelas lâminas III – V. Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009.

Esse mecanismo ascendente também é responsável pela ativação de neurônios localizados no bulbo rostroventral (RVM, *rostral ventral medulla*) e na substância cinzenta periaquedutal (PAG) no mesencéfalo (Figura 3). Uma vez ativadas, essas áreas são responsáveis pela ativação de mecanismos descendentes de controle da dor (JULIUS e BASBAUM, 2001).

O mecanismo descendente pode modular a nocicepção por interação com vários elementos neuronais no corno dorsal: (1) os próprios terminais das fibras aferentes primárias, (2) neurônios de projeção, (3) interneurônios excitatórios ou



inibitórios e (4) terminais de outras vias descendentes. Desta forma, o sistema descendente pode exercer tanto ações facilitatórias quanto inibitórias sobre a percepção de estímulos dolorosos, aumentando ou diminuindo a sensação de dor. Os mecanismos que medeiam o controle descendente inibitório atenuam a liberação de mediadores pró-nociceptivos (ações pré-sinápticas) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios), suprimem a excitação dos neurônios de projeção (ações pós-sinápticas) (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002).

O mecanismo descendente inibitório depende do envolvimento de outros neurotransmissores, e dentre as principais vias de controle da dor destacam-se as vias noradrenérgica, serotonérgica, dopaminérgica, opióide, canabinóide e adenosinérgica, sendo que um mesmo neurotransmissor pode exercer tanto ações inibitórias quanto facilitatórias, dependendo do local onde é liberado (MILLAN, 2002).

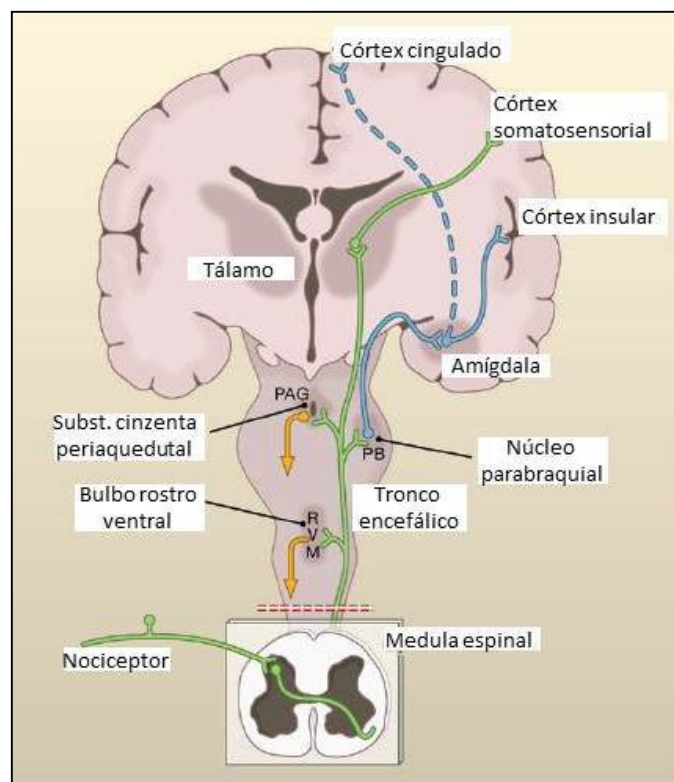


Figura 3 – Representação esquemática das vias ascendentes e descendentes da informação nociceptiva

Representação esquemática das vias ascendentes e descendentes da informação nociceptiva. A informação proveniente das fibras aferentes primárias é transmitida ao corno dorsal da medula espinhal, de onde é projetada ao córtex somatosensorial através do tálamo, onde ocorre a percepção da localização e intensidade do estímulo nocivo, e ao córtex cingulado e insular, através da amígdala, completando o componente emocional da dor. A informação ascendente também acessa neurônios do bulbo rostral ventral e substância cinzenta periaquedutal, ativando os sistemas de controle descendente da dor. Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009.

## 1.2. A Dor De Origem Inflamatória

A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, que constitui uma resposta fisiológica normal e homeostática desencadeada pelo organismo após lesão tecidual ou infecção local, com intuito de restabelecer as funções normais do tecido lesionado (SILVA, 2002). Após a lesão tecidual, o processo inflamatório se inicia com alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, ativação e migração de células imunes e alterações na liberação de fatores tróficos e fatores de crescimento (DRAY, 1995). As terminações sensoriais primárias e células não-neuronais, como fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas, produzem e liberam uma série de mediadores químicos capazes de alterar a excitabilidade neuronal, tanto por interação com canais iônicos presentes nos terminais nociceptivos, como por ligação a receptores específicos, ativando cascatas de sinalização intracelular mediadas por segundos mensageiros (JULIUS e BASBAUM, 2001). Tais mediadores incluem neurotransmissores, peptídeos como a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a bradicinina, eicosanóides como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, neurotrofinas, citocinas e prótons (MILLAN, 1999). Os nociceptores, por sua vez, expressam receptores para cada uma dessas substâncias pró-inflamatórias / pró-álgicas, e essas interações aumentam a excitabilidade das fibras nervosas, levando ao aumento da sensibilidade mecânica e térmica, caracterizada pelos quadros de hiperalgesia e alodinia, coletivamente referidos como *hipersensibilidade* (DRAY, 1995; McMAHON et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). Alguns exemplos de receptores, presentes nas fibras sensoriais primárias, capazes de interagir com os mediadores inflamatórios incluem receptores acoplados a proteína G (GPCRs), canais iônicos de potencial transitório (TRPs), canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) e receptores de tirosina cinase (TrK) (BASBAUM et al., 2009).

Alguns mediadores inflamatórios são capazes de modular diretamente canais iônicos (por exemplo, prótons extracelulares ativando ASICs e TRPV1), enquanto outros se ligam a seus receptores específicos em aferentes primários, ativando cascatas de sinalização intracelular que culminam com a ativação e modulação de canais iônicos. Um exemplo clássico deste tipo de modulação é a bradicinina, cuja

ligação ao receptor B2 induz a ativação da via da fosfolipase C (PLC), que por sua vez pode induzir a ativação da via adenilato ciclase/AMPC, levando à ativação de proteínas cinases como a PKC e a PKA, respectivamente. Estas, por sua vez, podem levar à ativação de canais TRPV1 e TRPA1, envolvidos na hipersensibilidade mecânica e térmica que acompanha os estados inflamatórios crônicos (LIEBMANN e BOHMER, 2000; WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009).

A hipersensibilidade oriunda do processo inflamatório normalmente desaparece quando há o controle ou a resolução da inflamação. No entanto, certas situações clínicas como, por exemplo, doenças neurodegenerativas e reumáticas, câncer, diabetes e neuropatias, acabam por instalar um processo inflamatório crônico, onde a estimulação constante dos nociceptores leva a alterações neuroplásticas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sensibilização central e periférica e manutenção do estado álgico (WOOLF e SALTER, 2000; McMAHON et al., 2005).

A sensibilização dos nociceptores é um dos principais fatores para o desenvolvimento da hipersensibilidade, tanto mecânica quanto térmica, decorrente da inflamação crônica. Embora os mecanismos não sejam ainda totalmente compreendidos, há evidências de que eventos como fosforilação de proteínas cinases, mobilização de cálcio e ativação de canais de sódio, aliado a diminuição das correntes de potássio, contribuem para a sensibilização dos nociceptores e conseqüente diminuição do seu limiar de ativação (CUNHA et al., 1999; VILLARREAL et al., 2009). Desta forma, algumas das principais vias de sinalização que parecem estar envolvidas nesta sensibilização são as vias das proteínas cinases A e C (PKA e PKC) e das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), em especial as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) (ALEY et al., 2001; LEVY e STRASSMAN, 2002; VILLARREAL et al., 2009).

Os mediadores inflamatórios, por sua vez, parecem participar tanto da ativação da PKA quanto da PKC, contribuindo para a hipersensibilidade. Alguns estudos comportamentais demonstram que mediadores como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), histamina e adenosina produzem hiperalgesia mecânica por meio de ativação da cascata AMPC/PKA, enquanto outros mediadores, como por exemplo a adrenalina, endotelinas e a bradicinina, parecem envolver a ativação da PKC para o desenvolvimento da hiperalgesia (KHASAR et al., 1999; ALEY et al., 2001; LEVY e STRASSMAN, 2002; SACHS et al., 2009).

Uma vez ativadas, as proteínas cinases fosforilam sítios específicos em proteínas-alvo, levando a mudanças transcricionais ou pós-translacionais, que por sua vez produzem várias respostas fisiológicas, incluindo a percepção da dor (YAJIMA et al., 2003). A PGE<sub>2</sub> liberada durante um processo inflamatório, por exemplo, induz um aumento dos níveis de AMPc em neurônios nociceptivos, levando portanto à ativação de PKA (SACHS et al., 2009); estudos demonstram que a ativação da via AMPc/PKA está relacionada a pelo menos três eventos modulatórios de canais iônicos voltagem-dependentes, que culminam com o aumento da excitabilidade dos nociceptores: 1) aumento das correntes de Na<sup>+</sup> em canais resistentes à tetrodotoxina, expressos em uma subpopulação de fibras sensoriais de pequeno diâmetro; 2) supressão das correntes retificadoras sustentadas de K<sup>+</sup>, que acredita-se serem responsáveis pela modulação do limiar de disparo; e 3) aumento das correntes de cátion ativadas por hiperpolarização, que acredita-se serem responsáveis pela facilitação do disparo repetitivo (LEVY e STRASSMAN, 2002). Desta forma, a sensibilização de nociceptores mediada por PKA, bem como o recrutamento de aferentes inicialmente insensíveis a estímulos mecânicos contribuiriam para a diminuição do limiar de ativação dessas fibras, levando à hiperalgesia e à alodinia (CUNHA et al., 1999; LEVY e STRASSMAN, 2002).

Há que se considerar, no entanto, que os mecanismos envolvidos na sensibilização dos nociceptores são complexos e muitas vezes inter-relacionados, de modo que a ativação de PKA pode aparecer como um fenômeno prévio à ativação de PKC, ou vice-versa, ou ainda ambas as vias podem culminar na ativação da cascata das MAPKs. Outros estudos sugerem ainda, que a ativação de ERK 1/2 participa do desenvolvimento da hipersensibilidade por meios independentes da ativação de PKA ou PKC (ALEY et al., 2001; JI e WOOLF, 2001; WANG et al., 2008; SACHS et al., 2009; VILLARREAL et al., 2009). Desta forma, sabe-se que essas vias de sinalização estão envolvidas no aumento da excitabilidade dos nociceptores, embora os mecanismos exatos desta ação não sejam totalmente esclarecidos.

### 1.3. A Dor Neuropática

*Dor neuropática*, de acordo com a definição da IASP, refere-se à dor originada como consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afeta o sistema somatosensorial (LOESER e TREEDE, 2008). Caracteriza-se por ser um processo crônico, sem função biológica protetora, onde a dor é resultante de uma lesão no sistema nervoso, seja em nervos periféricos, nos gânglios, ou ainda no sistema nervoso central (MILLAN, 1999; WOOLF e MANNION, 1999). Alguns estados patológicos relacionados à dor neuropática incluem a polineuropatia dolorosa causada por diabetes, a neuropatia pós-herpética, a neuralgia trigeminal, a dor neuropática central (devida a lesão da medula espinal, esclerose múltipla ou pós-infarto), a dor devida ao câncer, e estados pós-traumáticos ou pós-cirúrgicos (ATTAL et al., 2010).

Uma das principais características da dor neuropática, resultante de lesão nervosa periférica, é o aumento da sensação de dor. Além da dor espontânea (independente de qualquer estímulo), a hipersensibilidade (manifestada como hiperalgesia ou como alodinia) se apresenta como um dos principais aspectos relacionados à dor neuropática (MILLAN, 1999; WOOLF e MANNION, 1999). Essa hipersensibilidade se deve, principalmente, a alterações ocorridas na medula espinal, sendo comum manifestar-se bilateralmente, indicando alterações nos mecanismos centrais de controle da dor (CODERRE et al., 1993).

Após a lesão nervosa, o desenvolvimento da dor se dá inicialmente devido ao processo inflamatório gerado no local da lesão, onde os mediadores inflamatórios liberados sensibilizam os terminais nociceptivos, alterando seu limiar de ativação. A resposta inflamatória no sítio da lesão e nos tecidos adjacentes leva a alterações no meio, as quais envolvem acidose e infiltração de mastócitos, macrófagos e outras células imunes e liberação de mediadores como serotonina, ATP, óxido nítrico, leucotrienos, prostaglandinas e citocinas. Esses mediadores inflamatórios, por sua vez, podem exercer ações diretas ou indiretas contribuindo para o aumento da nocicepção (WOOLF e MANNION, 1999; MILLAN, 1999).

Uma vez iniciado esse processo, a estimulação repetitiva e/ou contínua das fibras C parece ser responsável pela dor persistente e pela sensibilização dos neurônios do corno dorsal, aumentando a sua excitabilidade e levando à

hipersensibilidade (WOOLF e MANNION, 1999). Esse fenômeno se dá principalmente pelo aumento da liberação de glutamato e substância P que, interagindo com seus respectivos receptores (principalmente NMDA e NK1), aumentam o influxo de  $Ca^{2+}$  e mantêm a despolarização necessária à transmissão do impulso nociceptivo. O aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  também leva à ativação da PKC, que por sua vez fosforila os receptores NMDA nos resíduos de serina e treonina, aumentando sua excitabilidade, levando assim à sensibilização central (WOOLF e MANNION, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; MILLIGAN e WATKINS, 2009). Outros eventos que se seguem à lesão nervosa incluem as descargas ectópicas em fibras aferentes primárias, decorrentes de uma lesão axonal direta ou da ruptura da bainha de mielina, e a degeneração das fibras nervosas, em especial no segmento distal, como consequência da interrupção do fluxo axonal normal (STEMKOWSKI e SMITH, 2012).

Outra alteração responsável pelo aumento da sensibilidade após lesão nervosa periférica é o brotamento dos terminais de fibras A $\beta$  na lâmina II do CDME, que ocorre após a lesão e/ou degeneração das fibras A $\delta$  e C (MANNION et al., 1996). Em situações normais, a lâmina II recebe apenas os impulsos provenientes das fibras nociceptivas. Com o brotamento das fibras A $\beta$  nesta lâmina, estas passam a interagir com neurônios nociceptivos de segunda ordem no corno dorsal, e desta forma os estímulos normalmente inócuos são percebidos como nocivos, caracterizando a hipersensibilidade (WOOLF e DOUBELL, 1994). Além disso, após a lesão nervosa, peptídeos como a substância P e o CGRP, normalmente expressos em terminais das fibras nociceptivas A $\delta$  e C, passam a ser expressos também em fibras A $\beta$ . Desta forma, estímulos de baixo limiar (não nocivos) transmitidos por essas fibras passam a liberar substância P no CDME, contribuindo para a geração do estado de hiperexcitabilidade central (WOOLF e MANNION, 1999).

Essa complexa relação entre a lesão nervosa e o desenvolvimento da dor explica, de certa forma, a dificuldade no desenvolvimento de uma terapia realmente eficaz no controle da dor neuropática. De fato, uma das características desse tipo crônico de dor é a refratariedade de grande parte dos pacientes aos tratamentos convencionais à base de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e opióides (WOOLF e MANNION, 1999; ATTAL et al., 2010), daí a necessidade de se identificar novos fármacos que possam ser utilizados junto ao arsenal terapêutico já existente.

#### 1.4. O Papel Dos Receptores De Potencial Transitório – TRPs

Conforme descrito anteriormente sobre a transmissão nociceptiva, as fibras aferentes primárias detectam os estímulos nociceptivos, sejam eles mecânicos, térmicos ou químicos, e os transmitem ao sistema nervoso na forma de corrente elétrica. Para tanto, os terminais nociceptivos expressam uma variedade de receptores e canais iônicos, que uma vez ativados iniciam a transmissão do impulso nervoso. Dessa forma, danos teciduais, inflamação ou lesão nervosa são situações que, direta ou indiretamente (via liberação de mediadores) levam à ativação dos nociceptores (AKOPIAN, 2011).

No caso das dores crônicas, quer sejam de origem inflamatória ou neuropática, o entendimento dos mecanismos que levam à hipersensibilidade ainda permanece sendo um dos principais pontos discutidos pela comunidade científica. Dentre os diversos tipos de transdutores da informação nociceptiva, membros da família de receptores de potencial transitório (TRPs, *Transient Receptor Potential*) têm sido descritos como importantes moduladores da hipersensibilidade mecânica e térmica que acompanha os estados crônicos de dor (CORTRIGHT et al., 2007; BASBAUM et al., 2009; STUCKY et al., 2009).

Os TRPs compreendem uma superfamília de canais iônicos permeáveis a cátions, distintos de outros grupos de canais iônicos por apresentarem uma grande diversidade na seletividade iônica, nos modos de ativação e nas funções fisiológicas (MONTELL, 2005). São divididos em seis subfamílias, de acordo com a homologia da sequência de proteínas: TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina). Em sua estrutura geral, os canais TRPs possuem seis domínios transmembranares, e tanto o terminal amino quanto o terminal carboxila são intracelulares (MORAN et al., 2011).

Vários canais TRPs são ativados diretamente por substâncias naturais, e os canais das subfamílias vanilóide (em especial TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4), melastatina (em especial TRPM8) e anquirina (TRPA1) são também referidos como *termoreceptores* ou *termo-TRPs*, uma vez que são capazes de responder a estímulos térmicos. Os canais TRPV estão associados à percepção do calor, sendo TRPV1 e TRPV2 ativados por calor nocivo (na faixa de 43°C e 52°C,

respectivamente), enquanto TRPV3 e TRPV4 são ativados por calor não nocivo (de 34 a 38°C e de 27°C a 34°C, respectivamente). Já os canais TRPA1 e TRPM8 estão associados à percepção do frio, sendo TRPA1 ativado por frio nocivo (abaixo de 17°C) enquanto TRPM8 está associado com a sensação “refrescante” ocasionada por temperaturas ao redor de 23 a 26°C (CALIXTO et al., 2005; MONTELL, 2005; CORTRIGHT et al., 2007).

Os canais TRPs estão envolvidos em uma diversidade de funções fisiológicas sensoriais, incluindo a visão, olfato e audição, além da percepção mecânica e térmica. No campo da nocicepção, os canais TRPV1 e TRPA1 têm sido descritos como moduladores importantes na transdução e na sensibilização em neurônios somatosensoriais aferentes primários. A expressão desses canais nos neurônios sensoriais que se projetam ao CDME sugere seu potencial envolvimento na modulação da liberação sináptica de neurotransmissores (CORTRIGHT et al., 2007) e os tornam capazes de iniciar o impulso nervoso sensorial após a detecção de estímulos químicos, mecânicos e térmicos (MONTELL, 2005; STUCKY et al., 2009; MORAN et al., 2011). A Figura 4 ilustra os principais *thermo-TRPs* envolvidos na nocicepção, bem como seus potenciais ativadores.

#### 1.4.1. Canais TRPV1

Os canais TRPV1 são canais de cátions não-seletivos, com alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , expressos nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, principalmente fibras C (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR e ABOOJ, 2012). Estes canais funcionam como um receptor polimodal nos terminais nervosos periféricos, modulando a transmissão sináptica entre os neurônios do GRD, GT ou GN com os neurônios do corno dorsal, do núcleo trigeminal espinal caudal ou do núcleo do trato solitário. São ativados por calor acima de 42°C, prótons, metabólitos do ácido araquidônico e capsaicina, entre outros. São também potencializados por agentes pró-inflamatórios e sensibilizados por ATP, bradicinina, glutamato, histamina, serotonina e fatores tróficos como o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (PREMKUMAR e ABOOJ, 2012).



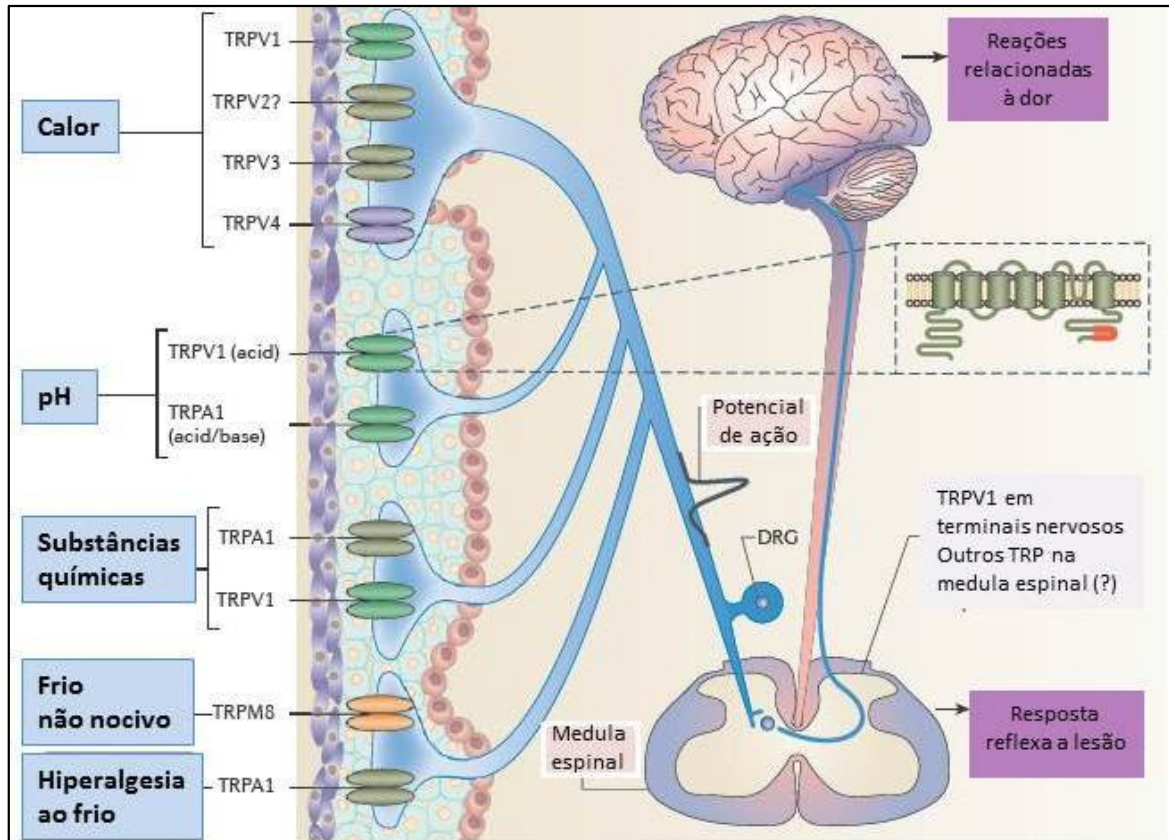


Figura 4 – Principais *thermo-TRPs* envolvidos na transmissão nociceptiva e seus principais ativadores

Múltipla expressão de TRPs nos neurônios sensoriais e seus principais ativadores. Membros da subfamília TRPV respondem a estímulos térmicos, sendo TRPV1 e TRPV2 responsivos ao calor nocivo, enquanto TRPA1 e TRPM8 respondem a estímulos frios. TRPV1 e TRPA1 são também ativados por substâncias químicas (por exemplo, capsaicina e cinamaldeído, respectivamente) e por alterações no pH. Fonte: Adaptado de MORAN et al., 2011.

Algumas situações patológicas, em especial as condições inflamatórias, podem reduzir o limiar térmico de ativação dos canais TRPV1, levando à sua ativação mesmo na temperatura corporal normal. A redução do pH do meio, aliado a um discreto aumento na atividade da PKC, pode resultar na ativação de correntes via canais TRPV1 a temperaturas próximas de 37°C (TOMINAGA et al., 1998; PREMKUMAR e AHERN, 2000; VELLANI et al., 2001; CORTRIGHT et al., 2007). A ativação de PKC sensibiliza profundamente as respostas mediadas por calor nos neurônios sensoriais, e essa resposta pode ser mimetizada por bradicinina e atenuada por inibidores da PKC. Além disso, as prostaglandinas liberadas na inflamação aumentam os níveis intracelulares de AMPc nos neurônios sensoriais, levando à ativação de PKA e subsequente sensibilização de canais TRP

(PREMKUMAR e ABOOJ, 2012). Coletivamente, estes dados demonstram a habilidade de TRPV1 em ativar respostas em condições inflamatórias, onde ocorre acidificação do tecido e liberação de mediadores pró-inflamatórios. A potencialização dos canais TRPV1, neste caso, leva à hipersensibilidade térmica e mecânica (AHERN et al., 2005). Além disso, a ativação de TRPV1 em fibras sensoriais também libera neuropeptídeos como a substância P e CGRP, causando aumento do fluxo sanguíneo e edema, algumas vezes referido como inflamação neurogênica (CORTRIGHT et al., 2007).

#### 1.4.2. Canais TRPA1

Os canais TRPA1 são canais de cátions não seletivos, altamente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ativados por substâncias como isotiocianato de alila (proveniente do óleo de mostarda), alicina (proveniente do alho), cinamaldeído (proveniente da canela), tetrahydrocannabinol, bradicinina (via receptor B2), produtos do estresse oxidativo como peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonenal, e ainda por prostaglandinas do tipo ciclopentenona, como a 15-deoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) (STORY et al., 2003; BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; ANDERSSON et al., 2008; MORAN et al., 2011; PREMKUMAR e ABOOJ, 2012). Adicionalmente, estímulos físicos como o frio nocivo (temperaturas abaixo de 17°C) e força mecânica também ativam TRPA1 (STORY et al., 2003; CORTRIGHT et al., 2007).

A maioria das fibras C e A $\delta$  que expressam TRPA1 também expressam TRPV1, demonstrando uma possível interação funcional. Além dos neurônios do GRD, os canais TRPA1 também são expressos no trato gastrointestinal, bexiga urinária, coração e células imunes (STORY et al., 2003; ANDRADE et al., 2006).

O envolvimento dos canais TRPA1 na hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio tem sido demonstrado em diversos modelos comportamentais. Embora o papel desses canais na sensibilidade ao frio em condições normais seja ainda controverso, há evidências suficientes que demonstram sua importância no desenvolvimento da hipersensibilidade ao frio em condições patológicas ou após lesão (OBATA et al., 2005; CORTRIGHT et al., 2007). A expressão de canais TRPA1 é induzida após lesão nervosa ou inflamatória, e o bloqueio desses canais

resulta na diminuição da hiperalgesia ao frio (OBATA et al., 2005). Adicionalmente, alguns estudos com animais *knockout* para TRPA1 e tratamentos com oligodeoxinucleotídeo *antisense* para TRPA1 demonstram uma redução no comportamento de hipersensibilidade ao frio após inflamação induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), lesão do nervo ciático ou ligadura do nervo espinal (OBATA et al., 2005; KATSURA et al., 2006; DEL CAMINO et al., 2010).

Também há controvérsias sobre o papel dos canais TRPA1 na nocicepção mecânica, embora haja evidências suficientes da sua importância (OBATA et al., 2005; BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al., 2006). Estudos com camundongos *knockout* demonstram a deficiência desses animais em sentir estímulos mecânicos nocivos pontuais; esses animais apresentam um limiar mecânico mais alto e resposta reduzida a uma série de estímulos supralimiares, quando comparado com os camundongos do tipo selvagem (KWAN et al., 2006). Além disso, os canais TRPA1 parecem ter um papel chave na sensibilização central relativa à hipersensibilidade mecânica, e desta forma parecem estar mais envolvidos na *manutenção* da hipersensibilidade (CORTRIGHT et al., 2007; PETRUS et al., 2007; EID et al., 2008; DA COSTA et al., 2010).

#### 1.4.3. TRPV1, TRPA1 e a Hipersensibilidade

Os diversos estudos relacionando os canais TRPV1 e TRPA1 com estados patológicos apontam para o fato de que esses canais desempenham um papel crítico na estimulação de nociceptores induzida por inflamação ou lesão (tecidual ou nervosa), desempenhando um importante papel na sensibilização (OBATA et al., 2005; BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al., 2006; CORTRIGHT et al., 2007; PETRUS et al., 2007; DA COSTA et al., 2010). Em estados inflamatórios, além da ativação direta desses canais, mediadores como bradicinina e PGE<sub>2</sub> levam à ativação do metabolismo fosfolipídico, aumento da atividade da PLC e de proteínas cinases como PKA e PKC, que por sua vez levam à ativação de canais TRPA1 e sensibilização de canais TRPV1 (CORTRIGHT et al., 2007; AKOPIAN, 2011). Desta forma, os canais TRPV1 estão envolvidos na hipersensibilidade térmica inflamatória e os canais TRPA1 contribuem, ao menos parcialmente, tanto para a

hipersensibilidade mecânica quanto térmica ao frio nos processos inflamatórios (AKOPIAN, 2011).

### **1.5. As Plantas Medicinais Como Fontes De Fármacos**

O uso de plantas para o tratamento de doenças é uma prática que data da Antiguidade, sendo que os primeiros registros escritos de uso de plantas medicinais datam de cerca de 1500 a.C., como o Papiro de Ebers, no Antigo Egito, que relacionava mais de 700 medicamentos, a maioria preparados a partir de plantas (LORENZI e MATOS, 2002; NEWMAN et al., 2008). Apesar dos avanços das indústrias química e farmacêutica, ainda hoje a medicina tradicional baseada em plantas medicinais constitui-se um importante pilar do sistema de saúde, uma vez que dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que a maioria da população de países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas como atenção primária à saúde, devido à falta de acesso aos medicamentos modernos (WHO, 2000; WHO, 2002; WHO, 2008). No Brasil, apesar dos avanços das últimas décadas, ainda é grande a parcela da população que depende do uso de plantas medicinais. Grande parte desta utilização tem fundamentação empírica, sendo que apenas uma pequena parcela dessas plantas apresenta estudos científicos que comprovam sua eficácia e segurança.

No entanto, a importância das plantas medicinais vai além do seu uso popular *in natura*. A observação etnofarmacológica, aliada ao avanço da pesquisa científica, permitiu ao longo dos anos a identificação de inúmeras moléculas de grande importância clínica, algumas das quais ainda hoje obtidas diretamente das fontes naturais. No caso específico da dor, e em especial a dor crônica, a terapia convencional baseia-se no uso de analgésicos opióides e AINEs (ATTAL et al., 2010), sendo que grande parte destes agentes tem ou teve sua origem em produtos naturais. Um exemplo clássico é a morfina, um potente analgésico opióide, ainda hoje extraída do ópio proveniente da papoula (*Papaver somniferum*). Outras substâncias igualmente importantes foram primariamente identificadas e isoladas de fontes naturais e posteriormente sintetizadas e/ou modificadas em laboratórios, sendo um exemplo clássico o ácido acetilsalicílico, um dos analgésicos mais

difundidos mundialmente, obtido inicialmente a partir da salicina, isolada da *Salix alba* (CALIXTO et al., 2000). No entanto, especialmente nos estados crônicos de dor, é grande o índice de refratariedade e/ou tolerância aos tratamentos convencionais com fármacos opióides e AINEs, além da grande incidência de efeitos indesejados, o que demonstra a necessidade da contínua busca por fármacos mais potentes e seguros.

Não apenas a dor, mas outras enfermidades também encontram nas plantas uma imensa fonte de potencialidades terapêuticas. Vários agentes antitumorais, por exemplo, atualmente utilizados clinicamente são derivados de plantas, como é o caso dos taxóis (paclitaxel e docetaxel, um derivado semi-sintético) e dos alcaloides da *Vinca* (vincristina, vimblastina e o derivado semi-sintético vinorelbina) (STÉVIGNY et al., 2005).

Estes são apenas alguns exemplos da importância da contribuição dos metabólitos extraídos de plantas para o desenvolvimento de fármacos. De fato, estima-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos sejam direta ou indiretamente derivados de plantas, demonstrando, portanto, que a pesquisa de princípios ativos extraídos de fontes naturais constitui-se uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo os processos que levam à dor e inflamação (CALIXTO et al., 2000).

## **1.6. Considerações Sobre O Gênero *Ocotea***

O gênero *Ocotea*, pertencente à família das Lauráceas, compreende cerca de 200 espécies distribuídas mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que no Brasil muitas espécies são de interesse madeireiro como, por exemplo, a *O. porosa* (popular imbuia) e a *O. odorifera* (popular sassafrás) (ZANIN e LORDELLO, 2007). Plantas desse gênero são características por produzirem uma grande variedade de alcaloides isoquinolínicos, principalmente do tipo aporfínicos, sendo 54 já relatados em diferentes espécies do gênero *Ocotea* (ZANIN e LORDELLO, 2007), vários deles com relatos em literatura a respeito de algumas de suas atividades biológicas (HUANG et. al., 1998; ZHOU et al., 2000;

HOET et al., 2004; STÉVIGNY et al., 2005). Além disso, diferentes espécies pertencentes ao gênero *Ocotea* apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória já descritas na literatura. A espécie *O. suaveolens*, por exemplo, apresenta atividade antinociceptiva na dor neurogênica e inflamatória induzida por formalina, enquanto espécies como a *O. quixos* e a *O. bullata* apresentam atividade anti-inflamatória, sendo esta última por inibição da ciclo-oxigenase 1. Estes dados sugerem, portanto, que plantas deste gênero podem ser alvos interessantes para a pesquisa de substâncias com potencial analgésico e anti-inflamatório (BEIRITH et al., 1999; ZSCHOCKE et al., 2000; COY et al., 2009; BALLABENI et al., 2010).

#### 1.6.1. *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

A *Ocotea puberula*, também conhecida como canela-guaicá, canela-amarela, canela-parda ou canela-sebo, é uma das plantas nativas mais comuns no Planalto Meridional ou Planalto Sul-Brasileiro (LORENZI e MATOS, 2002). Apresenta-se como uma árvore perenifólia com 10 a 15 metros de altura na idade adulta, de folhas subcoriáceas, cuja floração ocorre de julho a agosto, com o amadurecimento dos frutos de dezembro a fevereiro (CARVALHO, 2003; LORENZI e MATOS, 2002). Estudos etnobotânicos relatam o uso popular das folhas e cascas de *O. puberula*, entre índios das regiões do Paraná e Santa Catarina, no tratamento de afecções cutâneas (uso externo) e no combate a diarreias e disenterias (uso interno) (MARQUESINI, 1995).

Quanto à composição fitoquímica das cascas de *O. puberula*, estudos demonstram a presença de óleo essencial, esteroides/triterpenos, alcaloides, saponinas e taninos (FARAGO, 2002). Entre os alcaloides encontrados na espécie, foram descritos a ocoteína (IACOBUCCI et al., 1954; CAVA et al., 1968); a deidroocoteína e a dideidroocoteína (BARALLE et al., 1972); e a talicminina (BARALLE, et al., 1973). Posteriormente, a partir do extrato etanólico das folhas, ARAÚJO (2000), demonstrou a presença de nove alcaloides: ocoteína, dicentrina, predicentrina, N-metillaurotetanina, isodomeesticina, leucoxina, 3-hidroxicentrina e N-oxidodicentrina. ZANIN e colaboradores (2011) relatam ainda o isolamento dos alcaloides isodomeesticina, dicentrina e leucoxina em diferentes partes e fases do

desenvolvimento da planta (folhas, caules e raízes de mudas e folhas adultas). Com relação aos frutos desta espécie, no entanto, não foram encontrados relatos específicos a respeito da composição fitoquímica.

Uma curiosidade relacionada a *O. puberula* é o fato de alguns exemplares desta espécie, na região de Curitiba-PR, produzirem frutos fenotipicamente diferentes dos relatos encontrados na literatura (SOUZA e MOSCHETA, 2000). Diferente dos frutos pequenos e de cor preta, estas árvores produzem frutos maiores e de coloração marrom, mantendo a integridade das sementes (Figura 5). Os motivos desta diferenciação não foram investigados, no entanto, há relatos de que essa diferenciação se dê pela infestação da planta pelo fungo *Botryconis pallida*, cujo sintoma visual é a formação de galhas<sup>3</sup> nos frutos (HIRANO e POSSAMAI, 2008). Normalmente a formação de galhas está associada a alterações bioquímicas na planta, levando a modificação e/ou aumento na produção de metabólitos secundários, com o objetivo de defesa ou proteção (DE OLIVEIRA et al., 2006).

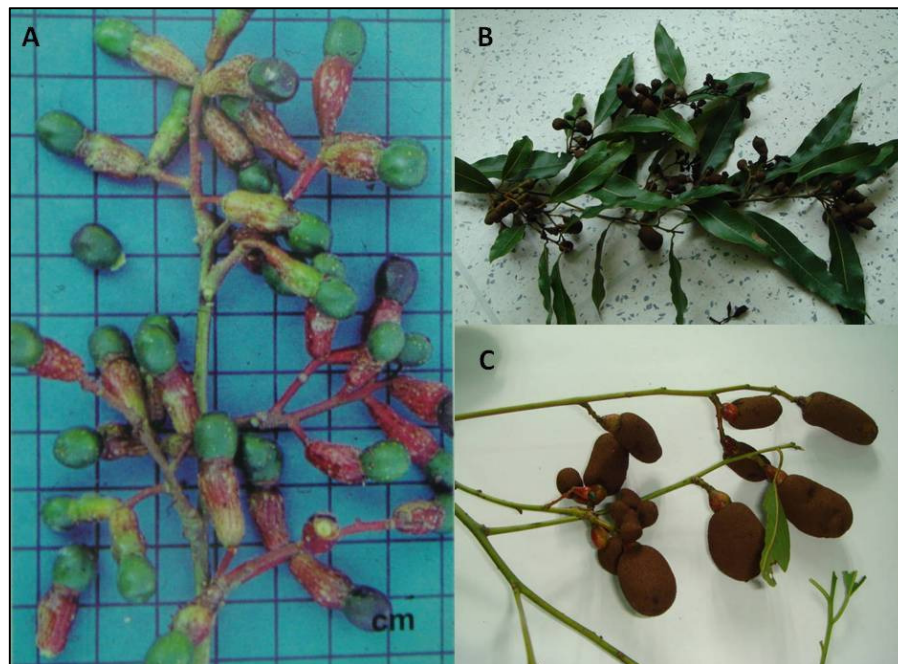


Figura 5 – Frutos de *Ocotea puberula*

A) frutos esféricos, de aproximadamente 1 cm, conforme descrição da literatura (Fonte: LORENZI e MATOS, 2002). B e C) ramo com frutos coletados na região de Curitiba, com crescimento diferenciado.

<sup>3</sup> Galhas são formas complexas de desenvolvimento atípico em plantas, cuja estrutura se origina através de hipertrofia e hiperplasia de tecidos, inibição do desenvolvimento ou modificação citológica em resposta ao ataque de organismos indutores que podem ser vírus, bactérias, fungos, nematódios, ácaros ou insetos (Mani, 1964, *Ecology of plant galls*, citado por De Oliveira, 2006).

Estes frutos fenotipicamente alterados foram coletados e analisados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, demonstrando a presença de esteroides/triterpenos e uma grande quantidade de alcaloides. Após extração, fracionamento e processos de isolamento e purificação, foi demonstrado que a fração alcaloídica do extrato destes frutos era composta majoritariamente pelo alcaloide aporfínico dicentrina, cuja ocorrência já foi relatada em folhas e cascas desta espécie.

#### 1.6.2. Alcaloides Aporfínicos e a Dicentrina

Os alcaloides compreendem uma classe de metabólitos secundários de plantas bastante abundante, com uma grande diversidade de substâncias amplamente distribuídas em diversas famílias. Apesar da diversidade de moléculas, a estrutura química dos alcaloides se caracteriza pela presença de um átomo de nitrogênio cíclico, independente da complexidade da molécula. Os alcaloides do tipo aporfínicos, por sua vez, constituem um subgrupo de compostos benzilisoquinolínicos com mais de 500 moléculas conhecidas, cuja estrutura fundamental é uma base tetracíclica formada pela ligação dos anéis aromáticos A e D de um núcleo benzilisoquinolínico típico (Figura 6, painel A), sendo o átomo de nitrogênio na posição 6 normalmente terciário (STÉVIGNY et al., 2005). De maneira geral, os alcaloides aporfínicos apresentam uma grande variedade de propriedades biológicas, tais como efeitos vasodilatadores, anticoagulantes, antioxidantes, antimicrobianos, antivirais e antitumorais (STÉVIGNY et al., 2005). Alguns exemplos mais relevantes de atividades relacionadas a este tipo de alcaloides, encontrados na literatura, incluem:

- (i) glaucina, com ação antifúngica e antidopaminérgica (MORTEZA-SEMNANI et al., 2003; RIBEIRO e LEITE, 2003);
- (ii) ocoteína, com atividades antitussígena, hipotensora e espasmolítica (ZHOU et al., 2000);
- (iii) nantenina, com ação anticonvulsivante (RIBEIRO e LEITE, 2003);



- (iv) dicentrinona, com atividade vasorelaxante e inibidora da enzima topoisomerase I (CHEN et al., 1997; ZHOU et al., 2000).

A dicentrina, cuja estrutura química é representada na Figura 6, painel B, é um alcaloide aporfínico relativamente comum, cuja presença já foi relatada em várias espécies das famílias Menispermaceae, Magnoliaceae e Lauraceae, incluindo diversas espécies do gênero *Ocotea* (STÉVIGNY et al., 2005; ZANIN e LORDELLO, 2007). Os primeiros estudos mais aprofundados a respeito de suas propriedades biológicas, no entanto, datam do início da década de 1990, quando um grupo de pesquisadores da Universidade Nacional de Taiwan publicou uma série de três estudos demonstrando efeitos inibidores da agregação plaquetária, vasorelaxantes e antihipertensivos da dicentrina, então isolada das raízes de *Lindera megaphylla*.

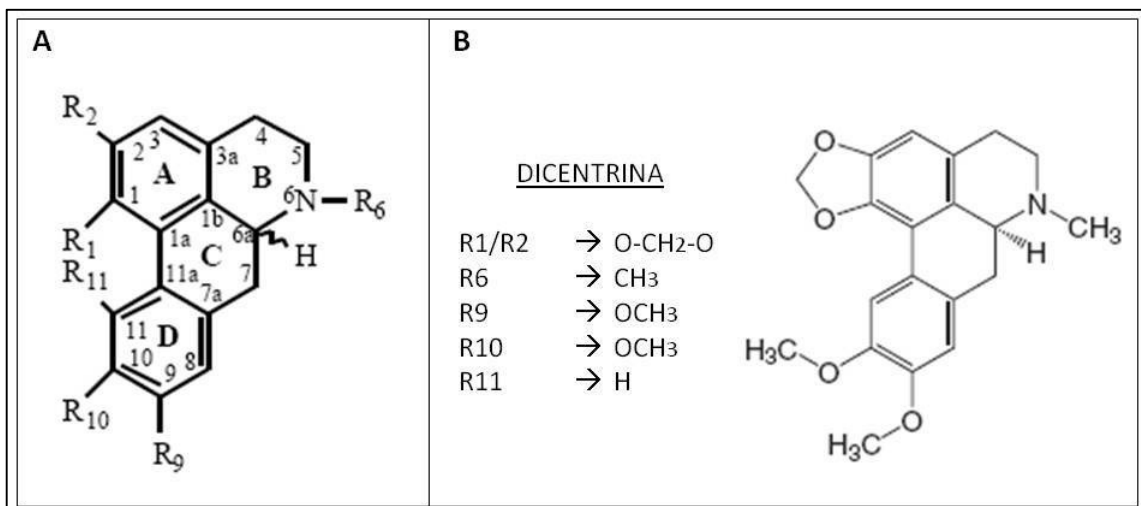


Figura 6 – Estrutura química dos alcaloides aporfínicos

A) Estrutura química básica dos alcaloides aporfínicos; B) substituições e estrutura química da dicentrina. Fonte: Adaptado de STÉVIGNY et al., 2005 e ZANIN et al., 2011.

No primeiro desses estudos, TENG e colaboradores (1991) demonstraram que a dicentrina era capaz de reduzir as contrações induzidas por noradrenalina e fenilefrina (ambos agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, sendo a fenilefrina seletiva para receptores  $\alpha_1$ ) em anéis isolados de aorta de ratos, sugerindo que este efeito vasorelaxante do alcaloide seria devido a um antagonismo de receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha_1$ . Na seqüência, YU e colaboradores (1992) descreveram

estudos *in vivo* utilizando uma linhagem de ratos espontaneamente hipertensos, demonstrando que a dicentrina administrada por via intravenosa era capaz de reduzir a pressão arterial nestes animais, sem causar nenhuma alteração na frequência cardíaca, e que esse efeito era muito menos pronunciado em animais normotensos. Seguindo essa linha o mesmo grupo publicou, em 1993, um estudo demonstrando que a dicentrina administrada por via oral era capaz também de reduzir os níveis de colesterol total e triglicérides em ratos hipertensos submetidos a uma dieta hiperlipídica (YU et al., 1993). Somados estes resultados, o grupo sugeriu então que a dicentrina teria potencial para a redução de dois grandes fatores de risco para doenças cardiovasculares – hipertensão e hiperlipidemia – e parte dessa ação seria mediada por antagonismo de receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha_1$ .

Apesar destas importantes observações, não foram encontrados na literatura estudos subsequentes sobre o potencial anti-hipertensivo ou os mecanismos de ação relacionados ao efeito anti-hiperlipidêmico da dicentrina. Entretanto, outras ações foram relatadas, como a inibição da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico (CHEN et al., 1996; CHEN et al., 1997), atividades antifúngica (MORTEZA-SEMNANI et al., 2003) e larvicida contra *Aedes aegypti* (GARCEZ et al., 2009), e ainda alguns efeitos antitumorais, *in vitro*, em diferentes linhagens de células tumorais de roedores e humanos. Coletivamente, os estudos a respeito das potencialidades antitumorais da dicentrina relatam uma atividade citotóxica moderada em linhagens de células leucêmicas de humanos (CCRF-CEM e HL-60) e murinos (L1210), linhagens de hepatoma humano (HuH-7 e MS-G2) e linhagens de carcinoma esofágico (HCE-6), e este efeito parece estar relacionado a uma propriedade de inibição da enzima topoisomerase II, envolvida na quebra das fitas de DNA para a replicação celular (STÉVIGNY et al., 2005; HOET et al., 2004; STÉVIGNY et al., 2002; WOO et al., 1999; HUANG et al., 1998).

Pela diversidade de efeitos causados pela dicentrina, pode-se afirmar que este alcaloide representa um exemplo de produto natural com grande potencial terapêutico, capaz de exercer atividades em múltiplos alvos (KONKIMALLA e EFFERT, 2010). Logicamente, questões como eficácia e segurança devem ser levadas em consideração, mas pode-se afirmar que o entendimento dos mecanismos relacionados e estes e outros possíveis efeitos é de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com potencial terapêutico. Pelas suas potencialidades, mesmo que não utilizada em sua forma natural, a

dicentrina pode ser um composto bastante útil como base, por exemplo, para a derivação química gerando compostos mais seguros e farmacologicamente mais potentes.

### **1.7. Justificativa**

Segundo dados da OMS, estima-se que cerca de 20% da população mundial adulta sofra de algum tipo de dor crônica (DOBKIN e BOOTHROYD, 2008). Em muitos casos, a falta de tratamento adequado ou a inexistência de um tratamento realmente efetivo acaba levando a disfunções e até mesmo incapacidade transitória ou permanente, afetando substancialmente a qualidade de vida e a capacidade produtiva desses pacientes. Neste sentido, a contínua busca por novas estratégias terapêuticas, que sejam eficazes e seguras, tem revelado alternativas bastante promissoras no controle da dor, relacionadas, por exemplo, ao exercício físico, terapia manual e acupuntura. No entanto, os medicamentos continuam a ser a principal ferramenta para o tratamento e controle dos estados dolorosos, e as plantas medicinais representam uma inesgotável fonte de substâncias para a pesquisa de produtos com potencial analgésico.

Algumas espécies de plantas do gênero *Ocotea*, por sua vez, apresentam marcada atividade antinociceptiva e anti-inflamatória descritas na literatura, sendo que plantas deste gênero são características por produzirem uma ampla variedade de alcaloides aporfínicos, muitos dos quais com propriedades farmacológicas já bem descritas. Aliado a isso, estudos prévios desenvolvidos no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Paraná demonstraram que os frutos de alguns exemplares de *Ocotea puberula*, da região de Curitiba-PR, produzem grandes quantidades de um alcaloide, isolado e identificado como dicentrina. Paralelamente, estudos realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação da Universidade Federal de Santa Catarina demonstraram uma importante ação antinociceptiva dos extratos desses frutos.

Somadas essas observações, e aliadas ao fato de que não há relatos na literatura a respeito de uma possível atividade antinociceptiva da *Ocotea puberula* ou da dicentrina isoladamente, torna-se pertinente o desenvolvimento de pesquisas que visem investigar esse possível efeito.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato de frutos de *Ocotea puberula* e do alcaloide *dicentrina*, isolado a partir da fração clorofórmica do extrato, em modelos experimentais de dor aguda e crônica em camundongos, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito antinociceptivo das frações orgânicas, obtidas por fracionamento do extrato bruto de frutos de *Ocotea puberula*, e da dicentrina em modelos agudos de nocicepção química: formalina e ácido acético;
- b) Avaliar o efeito antinociceptivo da dicentrina e o decurso temporal de seu efeito em modelos crônicos: nocicepção crônica inflamatória induzida por CFA e nocicepção crônica neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático;
- c) Investigar o possível envolvimento dos sistemas opióide, adrenérgico, serotoninérgico e canabinóide no efeito antinociceptivo da dicentrina;
- d) Investigar o possível envolvimento da dicentrina na modulação de vias dependentes de PKA e PKC como mecanismo de seu efeito antinociceptivo;
- e) Investigar possíveis efeitos inespecíficos da dicentrina, por meio de modelos de avaliação da atividade motora e modelos de sedação em camundongos;
- f) Investigar possíveis efeitos tóxicos da dicentrina, por meio de indicadores como ganho de peso corporal, peso relativo de órgãos vitais e níveis de enzimas hepáticas após tratamento crônico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Botânico

Os frutos de *Ocotea puberula* foram coletados em fevereiro de 2008, na região de Curitiba, estado do Paraná, de exemplares da espécie com o desenvolvimento atípico dos frutos. A identificação botânica foi feita no Museu Botânico de Curitiba, onde as exsicatas foram depositadas sob os números 342996, 342997 e 342998.

##### 3.1.1. Extração, Fracionamento, Isolamento e Identificação

Os frutos frescos (17,0 kg, equivalente a 10,0 kg em base seca) foram triturados com etanol e colocados em um extrator do tipo soxhlet, onde foram extraídos por refluxo com uma mistura de etanol e acetona (1:1) durante 24 horas. O extrato bruto obtido (cerca de 6 L) foi filtrado e submetido a um processo de concentração sob pressão reduzida, resultando em aproximadamente 500 mL do extrato concentrado. Este, por sua vez, foi submetido a um processo de fracionamento por partição líquido/líquido, com solventes de polaridade crescente, em extrator do tipo soxhlet modificado (CARVALHO et al., 2009).

A modificação no aparelho de soxhlet consiste em um alargamento do sifão lateral a partir da curva superior, impedindo o refluxo do solvente, permitindo a extração por gotejamento, a partir do material líquido. Para este processo de fracionamento, cada solvente permaneceu em contato com o extrato concentrado por 6 a 8 horas, obtendo-se ao final, quatro frações orgânicas: fração n-hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE) e fração residual alcoólica (RES). Estas frações foram concentradas até a remoção total dos solventes, resultando em resíduos secos correspondentes a 26,3 g (FH), 181,9 g (FC), 32,3 g (FAE) e 32,9 g (RES).

Sendo FC a fração obtida em maior quantidade (em percentual relativo ao material de partida), e positiva nos testes qualitativos para a presença de alcaloides, esta foi submetida a processos cromatográficos para separação de substâncias. A fração FC foi adsorvida em sílica gel 60 (70 – 230 mesh, Merck®) e submetida a um processo de separação por coluna cromatográfica, sendo a eluição feita em gradiente de polaridade crescente. Para tal, foram utilizadas como fase móvel porções de 100 mL da mistura n-hexano/clorofórmio, iniciando na proporção 70:30 e aumentando-se a polaridade em 5% até clorofórmio puro, seguindo para a mistura clorofórmio/metanol (95:05), com aumento de polaridade em 5% até a proporção de clorofórmio/metanol 70:30. O eluato foi coletado em porções de 10 mL e monitorado por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel uma mistura de tolueno/acetato de etila/dietilamina (8:90:2) e revelador Dragendorff. As frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas e o solvente foi deixado evaporar espontaneamente, permitindo a cristalização das substâncias separadas. Por este processo foram obtidos cristais brancos, os quais foram filtrados em funil de vidro sinterizado, lavados com metanol gelado e secos, resultando em cristais da substância pura, a qual foi submetida a processos de identificação.

Para a determinação do ponto de fusão foi utilizado um aparelho PF 1000 Gehaka (São Paulo, SP, Brasil), sendo estabelecido como 168-169° C. A rotação ótica foi determinada em um polarímetro Polartronic E (Schmidt + Haensch GmbH & Co., Berlim, Alemanha) como sendo  $[\alpha]_{D20}$ : +62,0° (c = 1,0 em clorofórmio). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em equipamento NMR Bruker DPX 200 a 200 MHz e 50 MHz, respectivamente, ambos em  $\text{CDCl}_3$ . A junção dos dados permitiu identificar a substância isolada como sendo o alcaloide aporfínico S-(+)-dicentrina (DCTN, Figura 6 painel B).

A pureza da dicentrina isolada, bem como sua quantificação na fração clorofórmica, foram obtidas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) utilizando uma coluna C18 – 5  $\mu\text{m}$  ACE (250 x 4,6 mm) e fase móvel composta por 15% de acetonitrila em água acidificada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,002N e  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2%), a um fluxo de 1 mL/min.

As frações FH, FC e FAE e a dicentrina isolada foram utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho, e as metodologias utilizadas serão expostas, na sequência, agrupadas conforme os artigos publicados ou submetidos.

### 3.2. Animais

Para os experimentos com animais foram utilizados camundongos Swiss machos de aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, em 09 de dezembro de 2010, sob número de registro 23080.027321/2010-94 (PP00462).

Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos em biotério próprio, em microisoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12h, com água e comida à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

### 3.3. Metodologias Utilizadas no Artigo 1 - Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated From Fruits of *Ocotea puberula*

#### 3.3.1. Nocicepção Induzida por Formalina

O teste de nocicepção induzida por formalina foi executado conforme metodologia previamente descrita por HUNSKAAR et al. (1985), e consiste na injeção de 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. O indicativo de nocicepção é o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada, durante os primeiros cinco minutos após a injeção (primeira fase ou fase neurogênica), e durante o intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase ou fase inflamatória). Os



animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.), FH, FC ou FAE (30 – 300 mg/kg, v.o.), ou com os controles positivos aspirina (400 mg/kg, v.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.) 60 minutos (v.o.) ou 30 minutos (s.c.) antes da injeção intraplantar de formalina, colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e observados com relação ao tempo de resposta nociceptiva durante as duas fases do modelo.

### 3.3.2. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O teste de nocicepção induzida por ácido acético foi executado conforme metodologia adaptada de KOSTER et al. (1959), e consiste na injeção intraperitoneal de 450 µL de uma solução de ácido acético a 0,6%. O indicativo de nocicepção é o número de contrações da musculatura abdominal, associadas ao alongamento dos membros posteriores, durante o período de 20 minutos. Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.), FC (30 – 300 mg/kg, v.o.), DCTN (30 – 300 mg/kg, v.o.) ou com o controle positivo aspirina (400 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm), e o número de contorções abdominais de cada animal foi contabilizado conforme acima descrito.

### 3.3.3. Avaliação do Possível Envolvimento do Sistema Opióide

Para avaliar se o sistema opióide poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo observado na fração FC, utilizou-se a metodologia descrita por SANTOS et al. (1999). Os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 20 minutos antes da administração de veículo (10 mL/kg, v.o.), FC (100 mg/kg, v.o.) ou do controle positivo morfina (2,5 mg/kg, s.c.), e a resposta nociceptiva a uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% foi avaliada 30 minutos após a injeção de morfina ou 60 minutos após a administração de FC ou veículo.

#### 3.3.4. Avaliação do Possível Envolvimento do Sistema Adenosinérgico

Para avaliar se o sistema adenosinérgico poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo observado na fração FC, utilizou-se a metodologia descrita por LUIZ et al. (2007). Os animais foram pré-tratados com cafeína (3 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos, 20 minutos antes da administração de veículo (10 mL/kg, v.o.), FC (100 mg/kg, v.o.) ou do controle positivo N<sup>6</sup> – ciclohexil adenosina (CHA, 0,03 mg/kg, i.p.), um agonista de receptores A1 de adenosina. A resposta nociceptiva a uma injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% foi avaliada 30 minutos após a injeção de CHA ou 60 minutos após a administração de FC ou veículo.

#### 3.3.5. Avaliação da Atividade Locomotora

A atividade locomotora foi executada utilizando-se o teste do campo aberto, conforme descrito por RODRIGUES et al. (2002), com o intuito de avaliar se os efeitos antinociceptivos observados poderiam estar relacionados com efeitos motores inespecíficos. Para tanto, os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.), FC (100 mg/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da exposição ao teste, o qual consiste na colocação do animal em uma caixa de madeira (40x60x50 cm) com o assoalho dividido em 12 quadrados de tamanhos iguais. Imediatamente após a colocação do animal na caixa, contabilizou-se o número de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos.

### **3.4. Metodologias Utilizadas no Artigo 2 – Antinociceptive Effect of Dicentrine: Evidence for a Role of TRPA1 Channels**

#### **3.4.1. Nocicepção Inflamatória Crônica Induzida por Adjuvante Completo de Freund**

O modelo inflamatório crônico foi executado conforme metodologia descrita por FERREIRA et al. (2001) com pequenas modificações. Os animais foram levemente anestesiados com éter antes de receberem uma injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA, suspensão autoclavada de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo mineral) diluído a 50% ou 80%, num volume de 20 µL, na superfície ventral da pata posterior direita. Os animais controles receberam uma injeção de 20 µL de veículo. A hipersensibilidade mecânica e térmica foram inicialmente avaliadas 24 horas após a injeção de CFA ou veículo, estendendo-se até o 15<sup>o</sup> dia após a injeção.

##### **3.4.1.1. Avaliação da hipersensibilidade mecânica**

A hipersensibilidade mecânica foi avaliada conforme previamente descrito por PALMER et al. (2008), com pequenas modificações. Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, permitindo acesso à superfície ventral das patas, e a hipersensibilidade foi avaliada como a resposta de retirada da pata frente à estimulação com filamentos de von Frey. Tais filamentos, com forças variando entre 0,02 a 4,0 g, foram aplicados perpendicularmente na superfície plantar da pata injetada, durante 5 s, com força suficiente para causar uma ligeira curvatura no filamento. A mediana do limiar de retirada da pata foi determinada utilizando uma adaptação do método *Up-Down* de Dixon (CHAPLAN et al., 1994). Uma vez determinados os valores basais, os animais foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) e avaliados nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após o tratamento. Após a avaliação de 24h, os animais receberam o tratamento diariamente.

#### 3.4.1.2. Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor

A hipersensibilidade térmica ao calor foi avaliada conforme previamente descrito por EDDY e LEIMBACH (1953) e adaptado por LUSZCZKI e CZUCZWAR (2007). Os animais foram colocados em uma placa aquecida a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  e a nocicepção foi registrada como o tempo de latência para a retirada da pata injetada, utilizando um tempo de corte de 20 s para evitar dano tecidual. Uma vez determinados os valores basais, os animais foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) e avaliados uma hora após o tratamento.

#### 3.4.1.3. Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio

A hipersensibilidade ao frio foi avaliada conforme o método descrito por FLATTERS e BENNET (2004), com pequenas modificações. Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, permitindo acesso à superfície ventral das patas, e 20  $\mu\text{L}$  de acetona foram gentilmente aplicados na superfície ventral da pata posterior direita. A resposta comportamental foi avaliada durante 30 s e registrada em escores: 0 – nenhuma resposta; 1 – rápida retirada ou movimento brusco da pata; 2 – retirada prolongada ou agitação repetida da pata; 3 – agitação repetida seguida de lambida da pata. A aplicação de acetona foi repetida três vezes, em intervalos de cinco minutos, e a soma dos escores foi utilizada para as análises estatísticas. Uma vez determinados os valores basais, os animais foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) e avaliados uma hora após o tratamento.

#### 3.4.2. Nocicepção Induzida por Capsaicina

Com a intenção de avaliar o possível envolvimento de canais TRPV1 no efeito antinociceptivo da dicentrina, os animais foram submetidos ao teste da capsaicina,

um ativador seletivo de canais TRPV1, conforme previamente descrito por SANTOS et al. (1999). Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) uma hora antes do teste, ou com o controle positivo AMG9810, um bloqueador de canais TRPV1 (30 mg/kg, i.p.) meia hora antes da injeção intraplantar de 20 µL de capsaicina (5 nmol/pata). Em outro grupo experimental, os animais receberam uma co-injeção da capsaicina (5 nmol/pata) com veículo (10 µL/pata), AMG9810 (90 nmol/pata) ou DCTN (300 nmol/pata), sempre num volume total de 20 µL. Após as injeções, os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante cinco minutos, sendo utilizado como indicativo de nocicepção.

#### 3.4.3. Nocicepção Induzida por Cinamaldeído

Com a intenção de avaliar o possível envolvimento de canais TRPA1 no efeito antinociceptivo da dicentrina, os animais foram submetidos a um teste utilizando o cinamaldeído, um ativador seletivo de canais TRPA1, conforme previamente descrito por ANDRADE et al. (2008). Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) uma hora antes do teste, ou com o controle positivo cânfora, um bloqueador de canais TRPA1 (7,6 mg/kg, s.c.) meia hora antes da injeção intraplantar de 20 µL de cinamaldeído (10 nmol/pata). Em outro grupo experimental, os animais receberam uma co-injeção do cinamaldeído (10 nmol/pata) com veículo (10 µL/pata), cânfora (25 nmol/pata) ou DCTN (300 nmol/pata), sempre num volume total de 20 µL. Após as injeções, os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante cinco minutos, sendo utilizado como indicativo de nocicepção.

Considerando os resultados obtidos com uma única dose de DCTN neste modelo, o passo seguinte foi avaliar a possível relação dose-resposta da dicentrina administrada por via oral (para avaliar o efeito sistêmico) ou por via intraplantar (para avaliar o efeito periférico) no tempo de reação de lambida da pata injetada e na hipersensibilidade ao frio. Para tanto, os animais foram pré-tratados com veículo (10

mL/kg, v.o.) ou doses crescentes de DCTN (10 – 100 mg/kg, v.o.) uma hora antes, ou com o controle positivo cânfora (7,6 mg/kg, s.c.) meia hora antes da injeção intraplantar de 20 µL de cinamaldeído (10 nmol/pata), enquanto outros grupos experimentais receberam uma co-injeção de cinamaldeído (10 nmol/pata) com veículo (10 µL/pata), cânfora (25 nmol/pata) ou DCTN (30 – 300 nmol/pata), sempre num volume total de 20 µL. Após as injeções, os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante cinco minutos, sendo utilizado como indicativo de nocicepção. Na sequência, 10 minutos após as injeções, os animais foram colocados em uma placa fria mantida a  $5 \pm 1^\circ \text{C}$ , e a hipersensibilidade ao frio foi avaliada como o tempo de latência para a retirada da pata injetada, utilizando um tempo de corte de 40 s para evitar dano tecidual.

### **3.5. Metodologias Utilizadas em Experimentos Adicionais**

#### **3.5.1. Avaliação dos Efeitos Centrais e Periféricos da Dicentrina no Modelo da Formalina**

O teste de nocicepção induzida por formalina foi executado conforme metodologia descrita por HUNSKAAR et al. (1985) e descrita no item 3.3.1. Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (30 – 300 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina, e colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm). Em outro bloco de experimentos, com o objetivo de avaliar a possível atividade periférica da dicentrina, esta foi administrada por via intraplantar, co-administrada com a formalina, nas doses de 10 – 100 µg/pata (equivalente a 30 – 300 nmol/pata). Em um terceiro bloco de experimentos, com o objetivo de avaliar a possível atividade central, a dicentrina foi administrada por via intratecal, nas doses de 1 – 30 µg/sítio (equivalentes a 3 – 90 nmol/sítio), 15 minutos antes da injeção intraplantar de formalina. Nos três blocos de experimentos, o tempo

que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e utilizado como indicativo de nocicepção.

### 3.5.2. Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos no Efeito da Dicentrina

#### 3.5.2.1. Avaliação da participação dos sistemas endógenos de controle descendente da dor

##### 3.5.2.1.1. Sistema opióide

Para avaliar se o sistema opióide poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo observado na dicentrina, utilizou-se a metodologia descrita por SANTOS et al. (1999). Os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 20 minutos antes da administração de veículo (10 mL/kg, v.o.), DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou do controle positivo morfina (2,5 mg/kg, s.c.), e a resposta nociceptiva a uma injeção intraplantar de formalina a 2,5% foi avaliada 30 minutos após a injeção de morfina e 60 minutos após a administração de DCTN ou veículo.

##### 3.5.2.1.2. Sistema adrenérgico

Para avaliar se o sistema adrenérgico poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo observado na dicentrina, utilizou-se a metodologia descrita por SANTOS et al. (2005). Os animais foram pré-tratados com prazosina (0,15 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, ou ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, 20 minutos antes da administração de veículo (10 mL/kg, v.o.), DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou dos controles positivos fenilefrina (10 mg/kg, i.p.), um agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, ou clonidina

(0,1 mg/kg, i.p.), um agonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. A resposta nociceptiva a uma injeção intraplantar de formalina a 2,5% foi avaliada 30 minutos após a injeção de fenilefrina ou clonidina, e 60 minutos após a administração de DCTN ou veículo.

#### 3.5.2.1.3. Sistema serotoninérgico

Para avaliar se a serotonina endógena poderia estar envolvida no efeito antinociceptivo observado na dicentrina, utilizou-se a metodologia descrita por LONGHI-BALBINOT et al. (2011). Os animais foram pré-tratados com p-cloro fenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de serotonina, uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos. Vinte minutos após a última administração de PCPA, os animais foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.), DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou com o controle positivo morfina (2,5 mg/kg, s.c.), e a resposta nociceptiva a uma injeção intraplantar de formalina a 2,5% foi avaliada 30 minutos após a injeção de morfina e 60 minutos após a administração de DCTN ou veículo.

#### 3.5.2.1.4. Sistema canabinóide

Para avaliar se o sistema canabinóide poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo observado na dicentrina, utilizou-se a metodologia adaptada de SIMÃO DA SILVA et al. (2011). Os animais foram pré-tratados com AM281 (1 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores canabinóides  $CB_1$ , ou AM630 (3 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores canabinóides  $CB_2$ , 30 minutos antes da administração de veículo (10 mL/kg, v.o.), DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou dos controles positivos anandamida (10 mg/kg, i.p.), um agonista de receptores canabinóides  $CB_1$ , ou win55, 212-2 mesilato (1,5 mg/kg, i.p.), um agonista de receptores canabinóides  $CB_2$ . A resposta nociceptiva a uma injeção intraplantar de formalina a 2,5% foi



avaliada 30 minutos após a injeção de anandamida ou win55, 212-2 mesilato, e 60 minutos após a administração de DCTN ou veículo.

### 3.5.2.2. Avaliação da participação das vias de proteínas cinases

#### 3.5.2.2.1. Hiperalgisia induzida por bradicinina, acetato miristato de forbol, forskolina e prostaglandina E<sub>2</sub>

Para avaliar o envolvimento das vias da PLC/PKC e AMPc/PKA no efeito antinociceptivo da dicentrina, os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.), 60 minutos antes da injeção intraplantar de 20 µL de bradicinina (BK, ativador indireto de PKC, 3 nmol/pata), acetato miristato de forbol (PMA, ativador de PKC, 0,1 nmol/pata), forskolina (FSK, ativador de adenilato ciclase, 10 nmol/pata) ou prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, ativador de PKA, 3 nmol/pata), de acordo com a metodologia adaptada de FERREIRA et al. (2005), MEOTTI et al. (2006) e NASCIMENTO et al. (2010). Após a injeção dos agentes algogênicos, os animais foram colocados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em uma plataforma elevada de assoalho aramado, permitindo acesso à superfície ventral das patas, e a hipersensibilidade foi avaliada 30 minutos depois, como o percentual de retirada da pata frente a 10 estimulações com filamento de von Frey de 1,0 g.

#### 3.5.2.2.2. Avaliação do envolvimento da proteína cinase A (PKA)

##### *a) Nocicepção induzida por forskolina*

Com o objetivo de avaliar o envolvimento da PKA no efeito antinociceptivo da dicentrina, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida por forskolina. Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou dicentrina (100 mg/kg, v.o.) uma

hora antes da injeção intraplantar de 20  $\mu$ L de forskolina (50 nmol/pata), e como controle, um grupo de animais recebeu apenas uma injeção intraplantar de veículo. A concentração de forskolina utilizada neste experimento foi baseada em experimentos prévios do nosso laboratório. Após as injeções, os animais foram colocados em acrílicos transparentes individuais (13x13x8 cm) e o tempo que permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 10 minutos, sendo utilizado como indicativo de nocicepção. Após este período os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram a medula e a pele da pata coletadas para avaliação da ativação da PKA por ensaio de *western blotting*.

#### *b) Preparação dos homogenatos*

As amostras de tecido foram individualmente homogeneizadas em tampão de lise (CLB, Cell Signaling Technology) e centrifugadas a 14.000 rpm durante 40 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e o teor de proteínas determinado por método colorimétrico (Reagente de Bradford, BioRad Laboratories), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, com a finalidade de igualar a concentração de proteínas nas amostras, estas foram individualmente diluídas em água destilada e imediatamente estabilizadas pela adição de 20% de tampão de amostra (Tris 300 mM contendo 10% de SDS, 25% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 50% de glicerol e 0,2% de azul de bromofenol) e fervura durante 5 minutos. Uma vez estabilizadas, as amostras foram mantidas a -20° C até o momento do uso.

#### *c) Ensaio de western blotting*

Para a realização do ensaio de *western blotting*, cada amostra foi utilizada em um volume que contivesse cerca de 40  $\mu$ g de proteínas, as quais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida as proteínas separadas no gel foram transferidas, também por eletroforese, para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas durante duas horas com solução de

bloqueio (TBS-T contendo 3% de albumina bovina), de modo a bloquear sítios de ligação inespecífica do anticorpo. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas *overnight*, sob refrigeração e agitação, com o anticorpo primário para as subunidades catalíticas fosforiladas da PKA (anti-p-PKA $\alpha$ / $\beta$ <sub>cat</sub>, Santa Cruz Biotechnology) ou com o anticorpo primário para  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology), utilizado como controle, ambos diluídos a 1:1000 em solução de TBS-T contendo 1,5% de albumina bovina. Após a incubação as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e então incubadas durante duas horas com o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase. A visualização das bandas imunorreativas foi feita utilizando o método de quimioluminescência (ECL) em filme radiográfico.

### 3.5.3. Nocicepção Neuropática Induzida por Ligadura Parcial do Nervo Ciático

Para avaliar o efeito da dicentrina em um modelo animal de dor neuropática, os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura parcial do nervo ciático (LPNC), conforme previamente descrito por MALMBERG e BASBAUM (1998). Os animais foram previamente anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e mantidos com isoflurano por via inalatória (1 a 2% em oxigênio). Após incisão no membro posterior direito, o nervo ciático foi exposto em sua porção distal e teve uma amarração feita com fio cirúrgico não absorvível, pegando de um terço a metade do nervo. Os animais falso-operados (*sham*) tiveram o nervo exposto, porém não foi feita a amarração. A incisão foi fechada e coberta com solução de iodo, e sete dias após a operação os animais foram avaliados quanto à hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, conforme previamente descrito nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.3.

### 3.5.4. Avaliação de Possíveis Efeitos Inespecíficos

#### 3.5.4.1. Avaliação da atividade locomotora e temperatura corporal

Para avaliar se a atividade antinociceptiva da dicentrina poderia ser decorrente de efeitos inespecíficos, os animais foram submetidos a dois testes para avaliação da atividade motora. No teste do campo aberto (RODRIGUES et al., 2002), os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (30 – 100 mg/kg, v.o.), e uma hora depois foram colocados no interior de uma caixa de madeira (40x60x50 cm) com o assoalho dividido em 12 quadrados de tamanhos iguais. Imediatamente após a colocação do animal na caixa, contabilizou-se o número de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos. Para o teste da barra giratória (MEOTTI et al., 2006), o aparato utilizado consiste numa barra de 2,5 cm de diâmetro, dividida em quatro compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro, mantida a uma rotação constante de 18 rotações por minuto. Os animais foram pré-selecionados 24h antes do teste, utilizando-se apenas aqueles capazes de permanecer na barra giratória por três períodos consecutivos de 60 s. Para o teste, os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (30 – 100 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes de serem colocados na barra giratória, e cronometrou-se o tempo que os animais permaneceram na barra, com um tempo de corte de 60 s.

Considerando ainda que alguns compostos podem induzir hipotermia, a temperatura corporal dos animais foi avaliada, na cavidade auditiva, utilizando-se um termômetro digital, uma hora após a administração de veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.).

#### 3.5.4.2. Avaliação do possível efeito sedativo

Para avaliar se o efeito antinociceptivo observado poderia estar relacionado a uma ação sedativa da dicentrina, utilizou-se um modelo previamente descrito por

HAJHASHEMI et al. (2010), onde avalia-se a potencialização da sedação induzida por cetamina. Os animais foram pré-tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.), DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou com o controle positivo diazepam (3 mg/kg, v.o.), 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg). O intervalo de tempo entre a administração da cetamina e a perda do reflexo de endireitamento foi contabilizado como o tempo de indução da sedação, enquanto o intervalo entre a perda e a recuperação do reflexo foi contabilizado como o tempo de duração da sedação.

#### 3.5.4.3. Avaliação de possíveis efeitos tóxicos: ganho/perda de peso, peso relativo de órgão, níveis de enzimas hepáticas e atividade locomotora após administração crônica

Para avaliar um possível efeito tóxico da dicentrina após administração crônica, os animais foram tratados com veículo (10 mL/kg, v.o.) ou DCTN (100 mg/kg, v.o.) uma vez ao dia, durante 14 dias. Uma hora após a última administração, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, conforme previamente descrito no item 3.3.5, e então deixados em jejum, com água à vontade, durante 12 horas. No 15º dia os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para a coleta de 1 mL de sangue. Em seguida os animais foram sacrificados e os órgãos vitais – coração, pulmões, fígado, baço e rins – foram retirados e pesados em relação ao peso corporal. As amostras de sangue foram coaguladas e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o soro foi utilizado para a dosagem de enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), com kit bioquímico Labtest Diagnóstica Ltda., de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.6. Drogas e Reagentes

As substâncias utilizadas, sua origem e eventuais características são listadas a seguir: acetonitrila (Tedia Brasil, RJ, Brasil); etanol, acetona, n-hexano,

clorofórmio, acetato de etila, sílica gel 60, ácido acético e formalina (Merck, Darmstadt, Germany); sulfato de morfina solução injetável (União Química, MG, Brasil); cloridrato de naloxona solução injetável e diazepam solução injetável (Cristália, SP, Brasil); aspirina, CHA, CFA, cinamaldeído, mentol, cânfora, fenilefrina, carragenina, prostaglandina E<sub>2</sub>, PMA e PCPA (Sigma-Aldrich, MO, EUA); capsaicina, prazosina, clonidina, ioimbina, bradicinina, forskolina, AMG9810, AM281, AM630, anandamida e Win55, 212-2 mesilato (Tocris Bioscience, Missouri, EUA); cloridrato de cetamina solução injetável e cloridrato de xilazina solução injetável (Syntec, SP, Brasil); dexametasona (Aché, SP, Brasil).

As frações orgânicas do extrato de *Ocotea puberula* foram dissolvidas em salina com 5% de Tween 80, aspirina e dicentrina foram diluídas em salina com 1% de DMSO e 5% de Tween 80, cânfora foi dissolvida em salina com 1% de etanol e 5% de Tween. As demais drogas foram dissolvidas em salina ou salina com 5% de Tween 80. As concentrações finais de DMSO e Tween 80 não ultrapassaram 1% e 5%, respectivamente, e não causaram nenhum efeito *per se*.

### 3.7. Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os dados de nocicepção inflamatória crônica por CFA e nocicepção neuropática por LPNC, bem como os mecanismos opióide, adrenérgico, serotoninérgico, canabinóide e adenosinérgico foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Os dados de hipersensibilidade ao frio pelo método da acetona foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores de DI<sub>50</sub> foram determinados por regressão não-linear [equação log (inibidor) vs resposta – inclinação variável] e reportados como a média geométrica com intervalo de confiança de 95%. Os dados de peso relativo de órgãos e dosagem de enzimas hepáticas foram analisados por teste t de Student. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados Apresentados No Artigo 1 - Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated From Fruits of *Ocotea puberula*

#### 4.1.1. Identificação e Doseamento da Dicentrina

Os cristais isolados a partir da fração FC foram submetidos a análises físico-químicas clássicas, como a determinação do ponto de fusão e rotação ótica, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os dados de RMN foram comparados com dados prévios publicados por ZANIN e LORDELLO (2007), permitindo identificar os cristais obtidos como sendo o alcaloide dicentrina. Os valores encontrados para o ponto de fusão (168-169°C) e para a rotação ótica (+62,0°) permitiram confirmar a identificação e ainda demonstrar a pureza da substância isolada, a qual foi confirmada pelo ensaio de CLAE.

A Figura 7 demonstra o perfil cromatográfico da dicentrina isolada (painel A) e da fração FC (painel B). No painel A, a dicentrina foi eluída em 17,06 minutos de corrida nas condições cromatográficas utilizadas, aparecendo como a principal substância na amostra analisada. O cálculo da área do pico referente à dicentrina, em relação à área total de todos os picos do cromatograma, permitiu avaliar a pureza do alcaloide isolado como sendo de 97%. No painel B, relativo à fração FC, apesar da presença de outras substâncias, a dicentrina ainda apareceu como composto majoritário, sendo posteriormente quantificada. Para essa quantificação, o próprio alcaloide isolado foi utilizado para a elaboração de uma curva padrão, com concentração variando de 5 a 100 µg/mL, conforme demonstrado na Tabela 1. Feita a correção pela pureza do alcaloide, o cálculo das áreas dos picos permitiu dosear a dicentrina presente na fração FC, definida como 57% (577,94 mg de dicentrina por grama de FC, Figura 8 e Tabela 1).

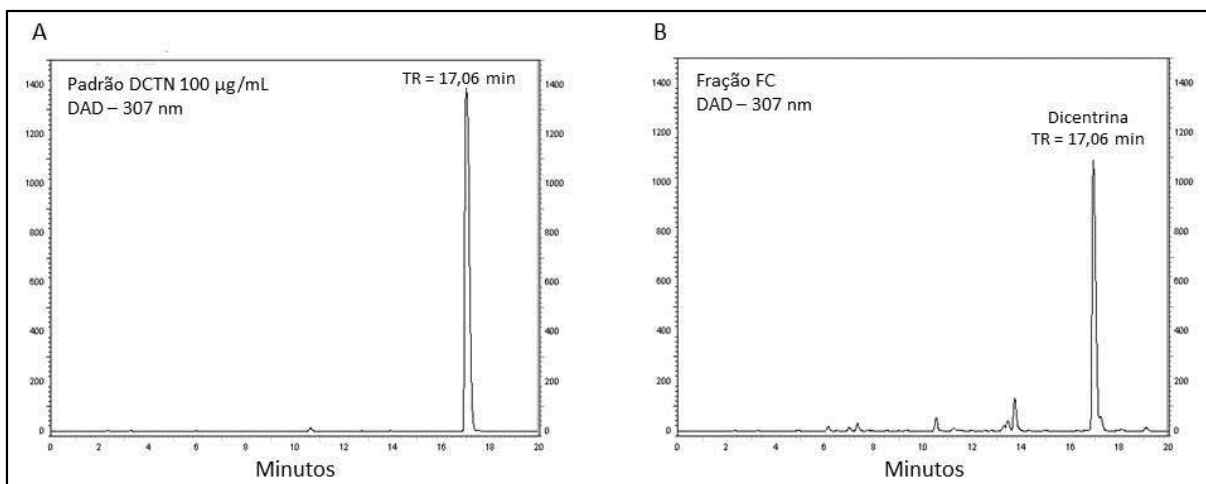


Figura 7 – Perfil cromatográfico por CLAE da fração FC e da dicentrina isolada a partir da fração FC

Perfil cromatográfico da dicentrina isolada a partir de FC (painel A) e da fração FC (painel B) por CLAE, utilizando uma coluna C18 – 5 µm ACE (250 x 4,6 mm) e fase móvel composta por 15% de acetonitrila em água acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,002N e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%), a um fluxo de 1 mL/min e detecção por DAD a 307 nm. A dicentrina (DCTN), com um tempo de retenção de 17,06 minutos, aparece como composto praticamente puro (painel A) e como composto majoritário na fração FC (painel B).

Tabela 1 – Curva de concentração da dicentrina por CLAE e quantificação na fração clorofórmica

Concentração do padrão (DCTN, µg/mL)*	TR** (min.)	Área do pico (mAU)
97	17,06	17474606
48,50	16,98	10305938
24,25	17,06	5396649
12,13	17,06	2783002
9,70	17,05	2245480
4,85	17,06	1105552
Concentração da fração FC (µg/mL)	TR** (min)	Área do pico (mAU)
100	17,06	10940201***
50	17,06	5902871***

\* Corrigido para 97% de pureza

\*\* Tempo de retenção na coluna

\*\*\* Equivalente a media de 577,94 mg de DCTN por grama da fração FC



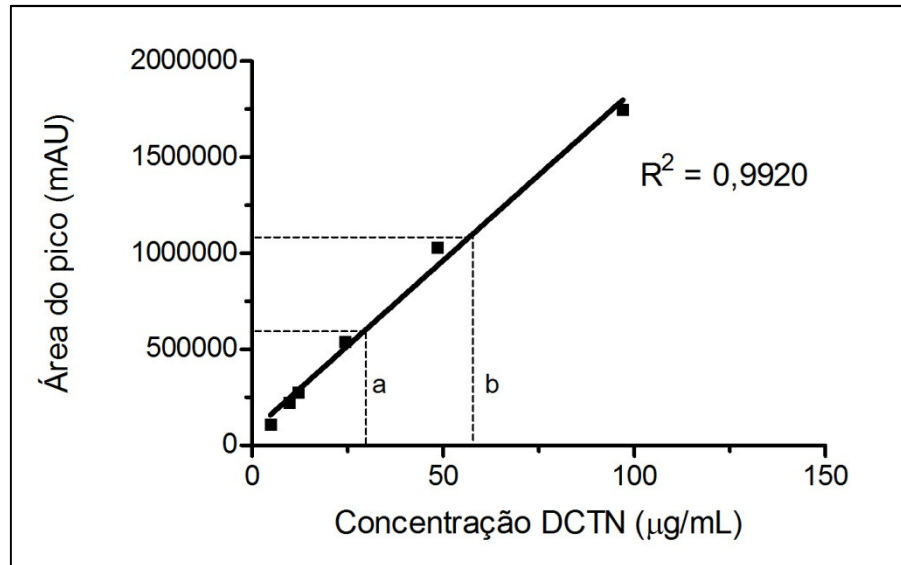


Figura 8 – Curva de concentração da dicentrina e doseamento na fração FC

Reta referente à curva de concentração da dicentrina. As linhas pontilhadas representam a interpolação da concentração de dicentrina presente na fração FC: a) 50 µg FC / mL, equivalente a 29,1 µg de dicentrina e b) 100 µg FC / mL, equivalente a 57,7 µg de dicentrina.

#### 4.1.2. Nociceção Induzida por Formalina

O teste da formalina foi utilizado para a avaliação inicial de possíveis efeitos antinociceptivos das frações FH, FC e FAE, utilizando como controles positivos a morfina e a aspirina. Conforme demonstrado na Figura 9 a fração FC, nas doses de 100 e 300 mg/kg, foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo dos animais nas duas fases da formalina, com uma  $DI_{50}$  de 190,0 mg/kg (127,6 – 282,8 mg/kg, considerando um intervalo de confiança de 95%) na fase neurogênica e 120,3 (88,6 – 163,3) mg/kg na fase inflamatória. As inibições encontradas na dose de 300 mg/kg foram  $65 \pm 8\%$  na fase neurogênica e  $91 \pm 7\%$  na fase inflamatória, semelhante ao controle positivo morfina ( $72 \pm 6\%$  na fase neurogênica e  $94 \pm 10\%$  na fase inflamatória). O analgésico anti-inflamatório não esteroide de referência utilizado, aspirina, foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo apenas na fase inflamatória, com uma inibição de  $66 \pm 7\%$ .

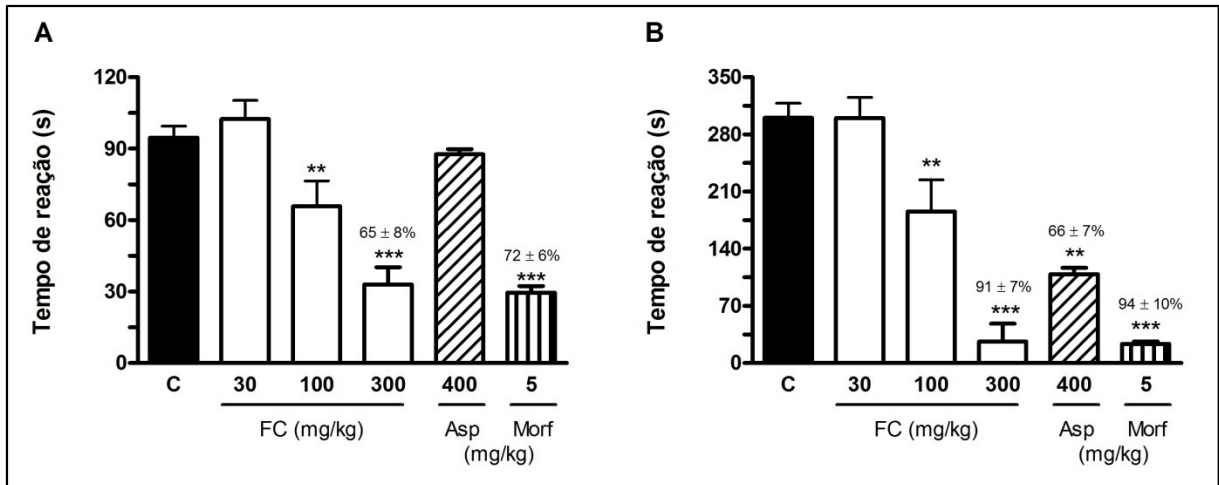


Figura 9 – Efeito da fração FC na nocicepção induzida por formalina

Efeitos da fração FC (30 – 300 mg/kg, v.o.), aspirina (Asp., 400 mg/kg, v.o.) e morfina (Morf., 5 mg/kg, s.c.) na fase neurogênica (painel A) e na fase inflamatória (painel B) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem às inibições observadas.

As frações FH e FAE, por outro lado, não apresentaram nenhum efeito antinociceptivo nas doses utilizadas (30 – 300 mg/kg), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Efeitos das frações FH e FAE na nocicepção induzida por formalina em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg)	Tempo de reação (s) (fase neurogênica)	Tempo de reação (s) (fase inflamatória)
Fração FH	0 (Controle)	106,4 ± 4,1	305,1 ± 17,6
	30	98,8 ± 2,8	286,5 ± 25,0
	300	82,3 ± 12,1	260,6 ± 28,8
Fração FAE	0 (Controle)	93,0 ± 8,3	284,0 ± 12,4
	30	74,8 ± 12,3	290,8 ± 25,4
	300	73,6 ± 8,8	248,5 ± 37,7

Dados expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 - 8). ANOVA de uma via, nenhuma diferença estatística entre os grupos.

#### 4.1.3. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Com a finalidade de confirmar o efeito antinociceptivo da fração FC, as mesmas doses (30 – 300 mg/kg) foram utilizadas no teste do ácido acético, um modelo de dor inflamatória somato-visceral. Conforme demonstrado na Figura 10, a fração FC causou uma redução do número de contorções abdominais quando comparado ao grupo controle. Tal redução apresentou um perfil relacionado à dose, com uma  $DI_{50}$  de 89,0 (52,5 – 150,9) mg/kg e inibição de  $92 \pm 6\%$  na maior dose utilizada (300 mg/kg). Quando o tratamento com a DCTN (30 – 300 mg/kg) foi utilizado, obteve-se um perfil antinociceptivo bastante semelhante, com uma  $DI_{50}$  de 75,7 (55,0 – 104,1) mg/kg e uma inibição de  $87 \pm 3\%$  na maior dose utilizada, similar ao controle positivo aspirina (400 mg/kg) que apresentou uma inibição de  $84 \pm 4\%$  (Figura 10).

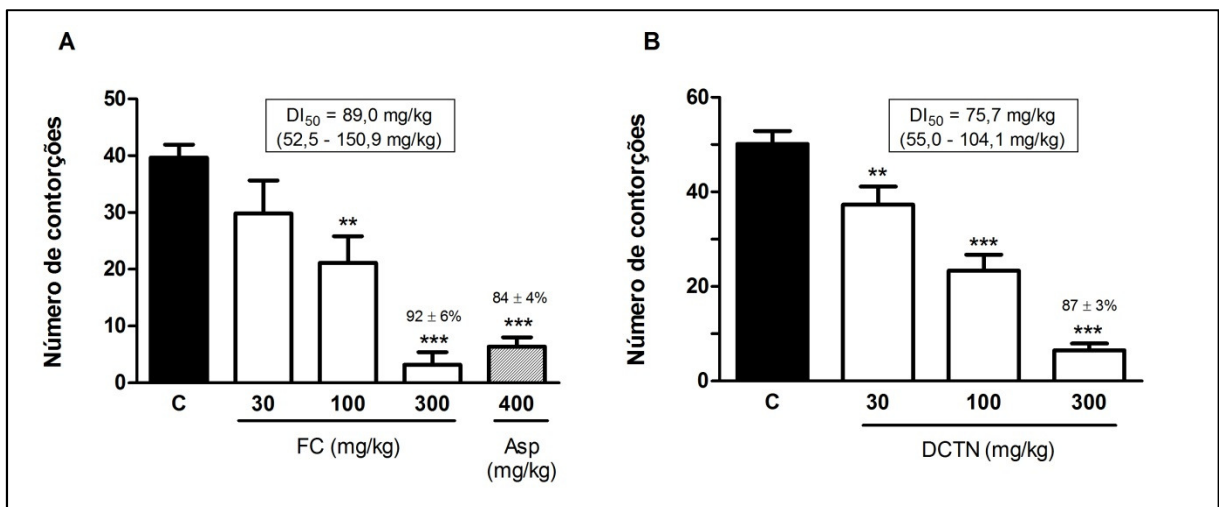


Figura 10 – Efeito da fração FC e DCTN na nocicepção induzida por ácido acético

Efeitos da fração FC (30 – 300 mg/kg, v.o., painel A), aspirina (Asp., 400 mg/kg, v.o., painel A) ou DCTN (30 – 300 mg/kg, v.o., painel B) na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem às inibições observadas.

#### 4.1.4. Envolvimento dos Sistemas Opióide e Adenosinérgico

Conforme ilustrado na Figura 11, os efeitos antinociceptivos tanto da morfina (2,5 mg/kg, agonista opióide) quanto do CHA (0,03 mg/kg, agonista adenosinérgico) foram revertidos pelo pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, antagonista opióide) e cafeína (3 mg/kg, antagonista adenosinérgico), respectivamente. No entanto, nenhum dos antagonistas foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da fração FC (100 mg/kg) frente ao modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

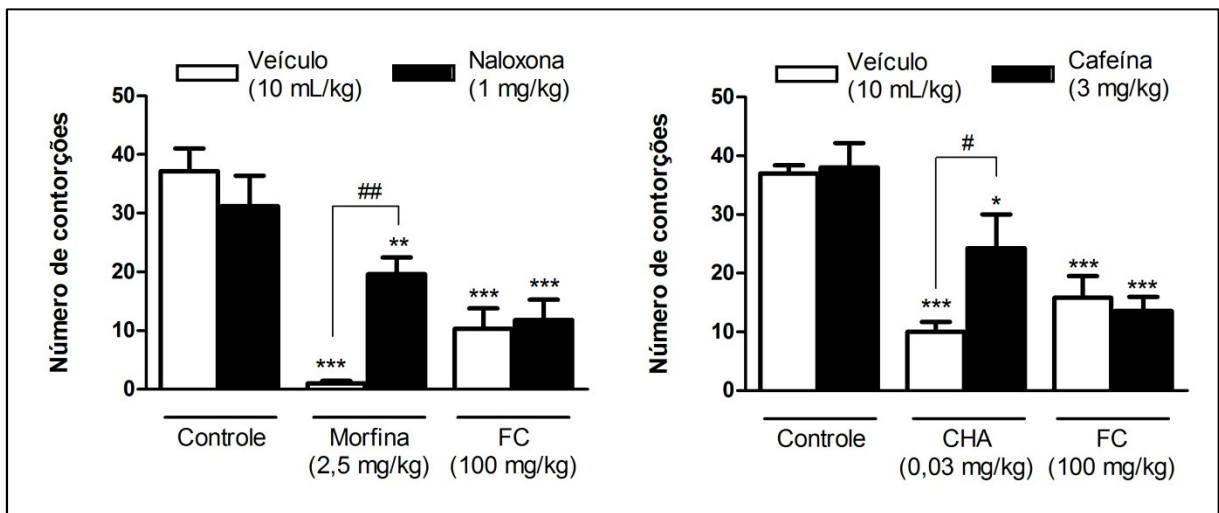


Figura 11 – Envolvimento dos sistemas opióide e adenosinérgico

Efeitos do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., painel A) ou cafeína (3 mg/kg, i.p., painel B) no efeito antinociceptivo da fração FC (100 mg/kg, v.o.), morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou CHA (0,03 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por ácido acético em camundongos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle e #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  quando comparados com os agonistas morfina ou CHA (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

#### 4.1.5. Atividade Locomotora

Com a finalidade de descartar uma ação de diminuição da atividade locomotora, o teste do campo aberto foi executado após o tratamento dos animais com FC ou DCTN. Os animais tratados com FC (100 mg/kg) tiveram uma média de

cruzamentos de  $105,4 \pm 8,5$  contra  $112,7 \pm 8,1$  do grupo controle, enquanto o grupo tratado com DCTN (100 mg/kg) apresentou uma média de cruzamentos de  $106,5 \pm 7,9$  contra  $113,0 \pm 3,8$  do grupo controle, não havendo nenhuma diferença estatisticamente significativa.

## **4.2. Resultados Apresentados no Artigo 2 – Antinociceptive Effect of Dicentrine: Evidence for a Role of TRPA1 Channels**

### **4.2.1. Hipersensibilidade Mecânica Induzida por CFA**

Considerando o efeito antinociceptivo da dicentrina em modelos agudos, sua atividade foi avaliada também em um modelo crônico, neste caso um modelo inflamatório induzido pela injeção intraplantar de CFA. A hipersensibilidade mecânica foi avaliada por meio de filamentos de von Frey, iniciando-se 24 horas após a injeção de CFA e estendendo-se até o 15º dia pós-injeção. Conforme ilustrado na Figura 12, o CFA a 50% induziu uma diminuição do limiar de retirada da pata em relação ao grupo controle, o qual recebeu uma injeção intraplantar de veículo. A DCTN (100 mg/kg, v.o.), por sua vez, foi capaz de reverter essa hipersensibilidade, aumentando o limiar de retirada da pata em relação ao grupo CFA tratado apenas com veículo. O efeito máximo da DCTN ocorreu uma hora após o tratamento por via oral, estendendo-se até duas horas e sendo mantido enquanto a DCTN foi administrada uma vez ao dia, até o 11º dia. Quando o tratamento foi interrompido por dois dias, a hipersensibilidade foi novamente observada. Quando o tratamento foi restaurado, no 14º dia, a DCTN novamente foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata, com uma resposta em função do tempo bastante similar ao observado no primeiro dia de tratamento.

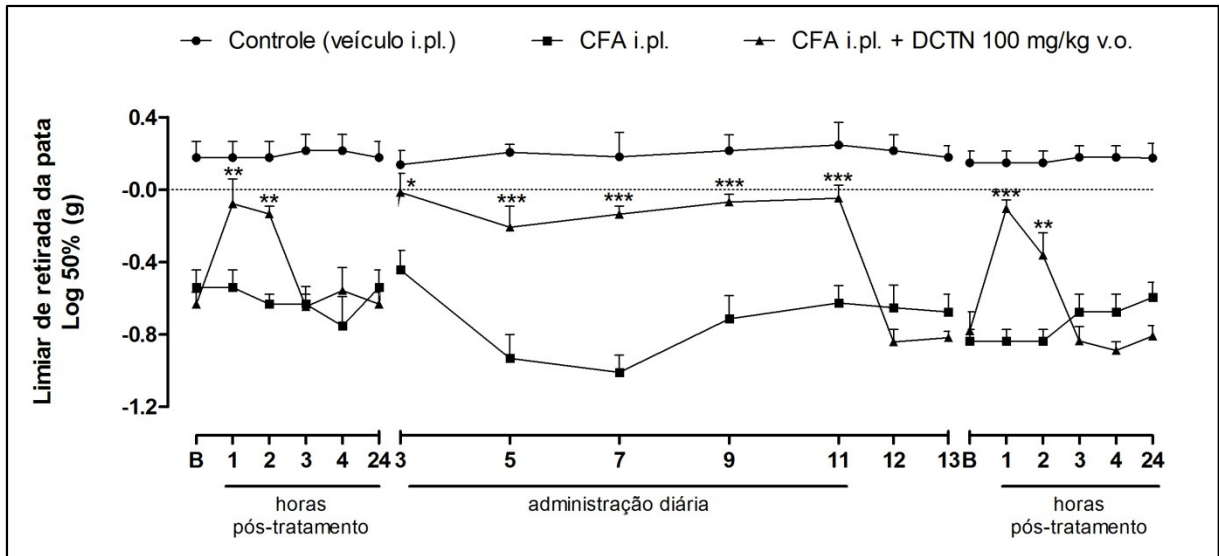


Figura 12 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 50%

Efeito da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 50%. No 1º e no 14º dias, as avaliações correspondem aos tempos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após o tratamento com DCTN, e as demais avaliações correspondem ao tempo de 1h após o tratamento. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo CFA i.pl. (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

Essa concentração de 50% de CFA, no entanto, não foi capaz de induzir hipersensibilidade ao frio, o que levou à execução de um novo experimento, utilizando CFA 80%. Conforme demonstrado na Figura 13, o efeito da dicentrina em função do tempo foi bastante similar ao experimento precedente, com duração de até duas horas. A hipersensibilidade mecânica foi avaliada no 7º e no 10º dia pós-injeção, sempre uma hora após a administração oral da DCTN, e as inibições observadas foram de  $68 \pm 13\%$  e  $65 \pm 10\%$ , respectivamente.

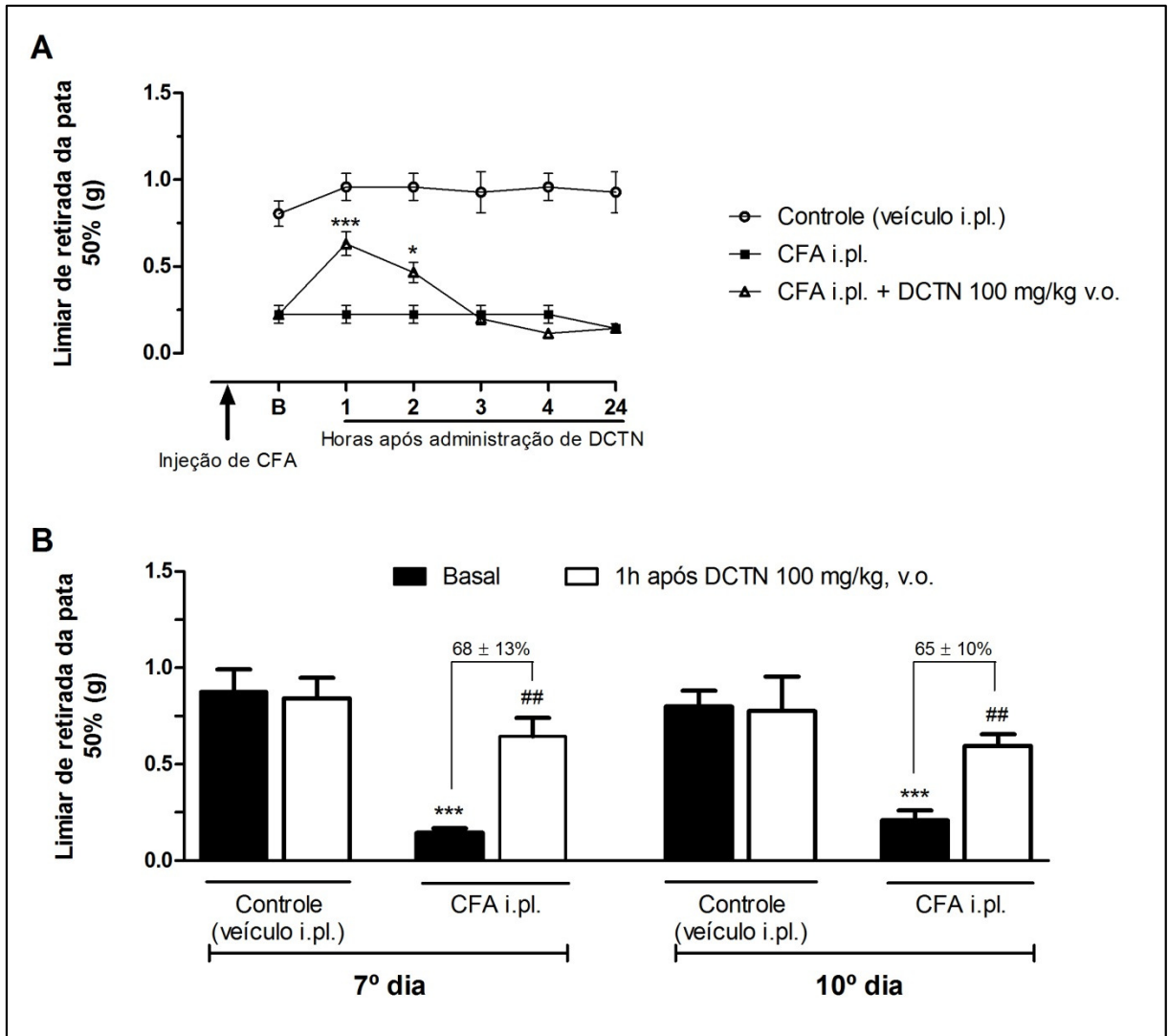


Figura 13 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 80%

Efeito da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA 80%. Painel A: efeito da DCTN em função do tempo, avaliada nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração; cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais e os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo CFA i.pl. (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni). Painel B: efeito da DCTN no 7º e 10º dias após a injeção de CFA, avaliado antes da administração de DCTN (basal) e 1h após a administração de DCTN; cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais e os níveis de significância são indicados por \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao respectivo basal do grupo CFA i.pl. (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem ao percentual de reversão observado.

#### 4.2.2. Hipersensibilidade Térmica Induzida por CFA

A hipersensibilidade ao frio foi avaliada no 2º, 4º e 7º dias após a injeção de CFA 80% e, conforme apresentado na Figura 14 (painel A), a DCTN (100 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir as respostas à acetona com inibições de  $79 \pm 6\%$ ,  $86 \pm 4\%$  e 100%, respectivamente, sem nenhum efeito *per se* (dado não mostrado). No entanto, quando utilizado o modelo da placa quente, a DCTN não foi capaz de aumentar o tempo de latência para retirada da pata, indicando não ter efeito na hipersensibilidade ao calor (Figura 14, painel B).

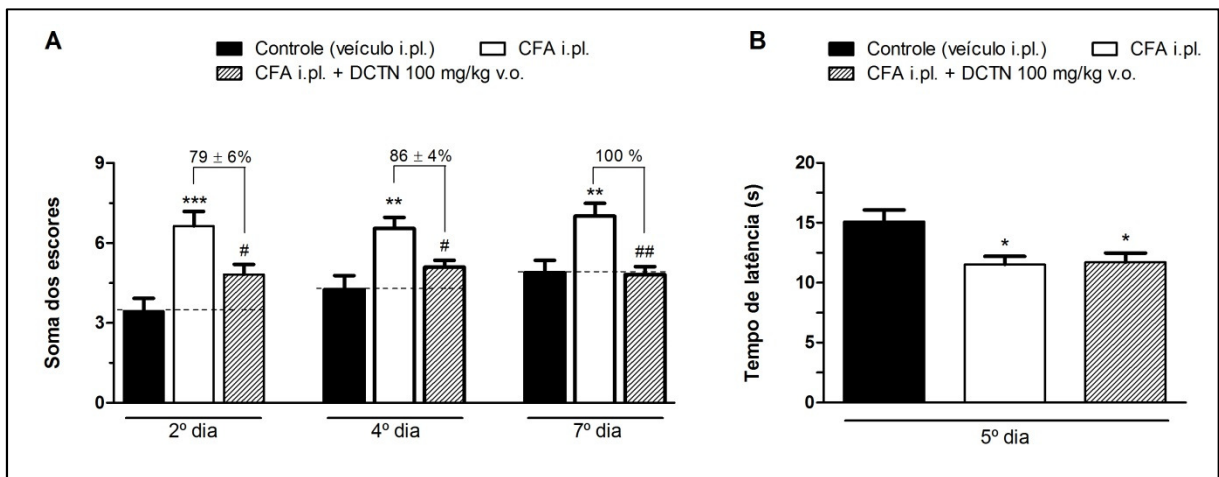


Figura 14 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade térmica induzida por CFA 80%

Efeitos da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade ao frio (painel A) e ao calor (painel B), induzidas por CFA 80%. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 10 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle e #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$  quando comparados ao grupo CFA i.pl. (painel A - teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; painel B - ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem ao percentual de reversão observado.

#### 4.2.3. Nociceção Induzida por Capsaicina e Cinamaldeído

Considerando o efeito antinociceptivo da dicentrina na hipersensibilidade ao frio, mas não ao calor, foi investigado o possível papel dos canais TRPA1 e TRPV1. Conforme demonstrado na Figura 15, a capsaicina (ativador de canais TRPV1)



induziu uma resposta nociceptiva caracterizada pela lambida da pata injetada, a qual foi revertida pelo AMG9810 (bloqueador de canais TRPV1) administrado por via intraperitoneal ou intraplantar, mas não foi revertida pela DCTN. Por outro lado, assim como a cânfora (bloqueador de canais TRPA1), a DCTN foi capaz de reduzir o tempo de resposta induzido pelo cinamaldeído (ativador de canais TRPA1), quando administrada tanto por via oral (100 mg/kg) quanto por via local (intraplantar, 300 nmol/pata), com inibições de  $75 \pm 1\%$  e  $41 \pm 10\%$ , respectivamente (Figura 16). Estes resultados alinham-se com os observados na hipersensibilidade térmica, onde a DCTN foi capaz de reverter a hipersensibilidade ao frio, mas não ao calor nocivo.

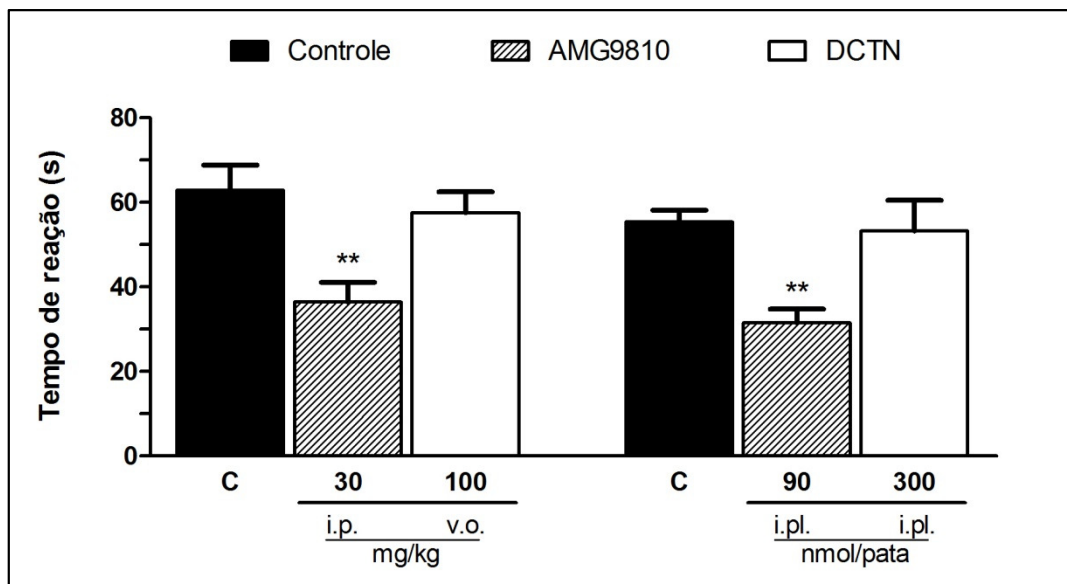


Figura 15 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por capsaicina

Efeitos da DCTN administrada por via oral (100 mg/kg) ou intraplantar (300 nmol/pata) ou do antagonista de canais TRPV1, AMG9810, administrado por via intraperitoneal (30 mg/kg) ou intraplantar (90 nmol/pata) na nocicepção induzida por capsaicina. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais e os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Considerando, portanto, o possível envolvimento dos canais TRPA1 no efeito antinociceptivo da dicentrina, foram utilizadas diferentes doses do alcaloide por via oral (10 – 100 mg/kg) e por via intraplantar (10 – 100  $\mu$ g/pata, equivalente a 30 – 300 nmol/pata), para avaliação das respostas de nocicepção espontânea, caracterizada pelo tempo de lambida da pata, e de hipersensibilidade ao frio, caracterizada como o tempo de latência para retirada da pata na placa fria.

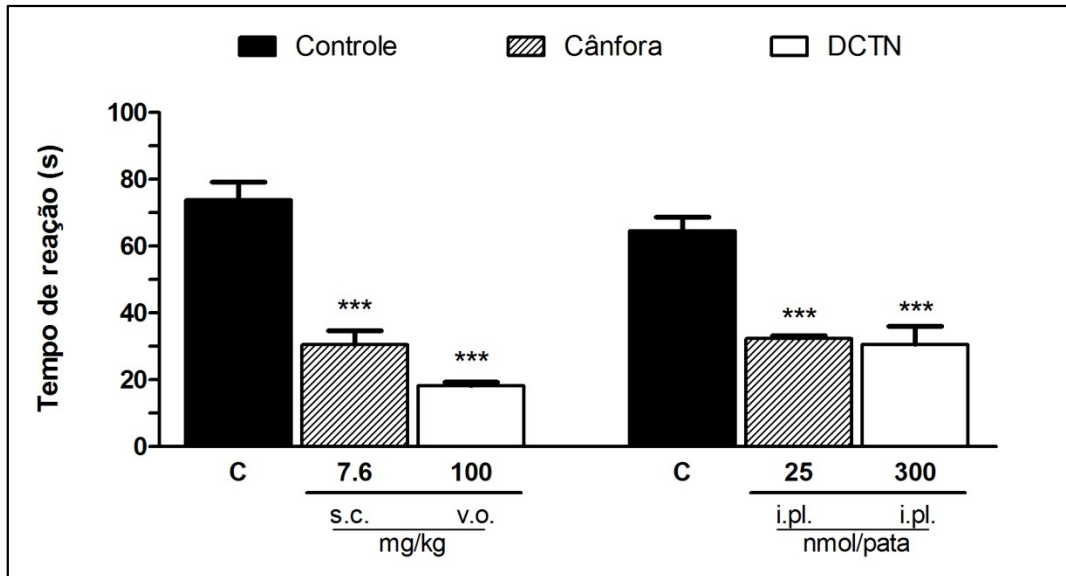


Figura 16 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por cinamaldeído

Efeitos da DCTN administrada por via oral (100 mg/kg) ou intraplantar (300 nmol/pata) ou do antagonista de canais TRPA1, cânfora, administrado por via subcutânea (7,6 mg/kg) ou intraplantar (25 nmol/pata) na nocicepção induzida por cinamaldeído. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais e os níveis de significância são indicados por \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Conforme demonstrado na Figura 17, a DCTN foi capaz de reduzir o tempo de resposta na nocicepção espontânea, e também aumentar o tempo de latência na placa fria, ambos de maneira dependente da dose. Quando administrada por via oral, a DCTN diminuiu o tempo de resposta na nocicepção espontânea com uma  $DI_{50}$  média de 80,1 (41,5 – 154,7) mg/kg e aumentou o tempo de latência para retirada da pata na placa fria em  $80 \pm 13\%$ , similar ao controle positivo cânfora ( $84 \pm 17\%$ ). Quando administrada por via intraplantar, coinjectada com o cinamaldeído, a DCTN também reduziu o tempo de resposta na nocicepção espontânea com uma  $DI_{50}$  média de 221,5 (138,4 – 354,4) nmol/pata. Na placa fria, a dose de 300 nmol/pata foi capaz de aumentar o tempo de latência para retirada da pata em  $42 \pm 5\%$ , enquanto o controle positivo cânfora aumentou o tempo de latência em  $80 \pm 4\%$ .

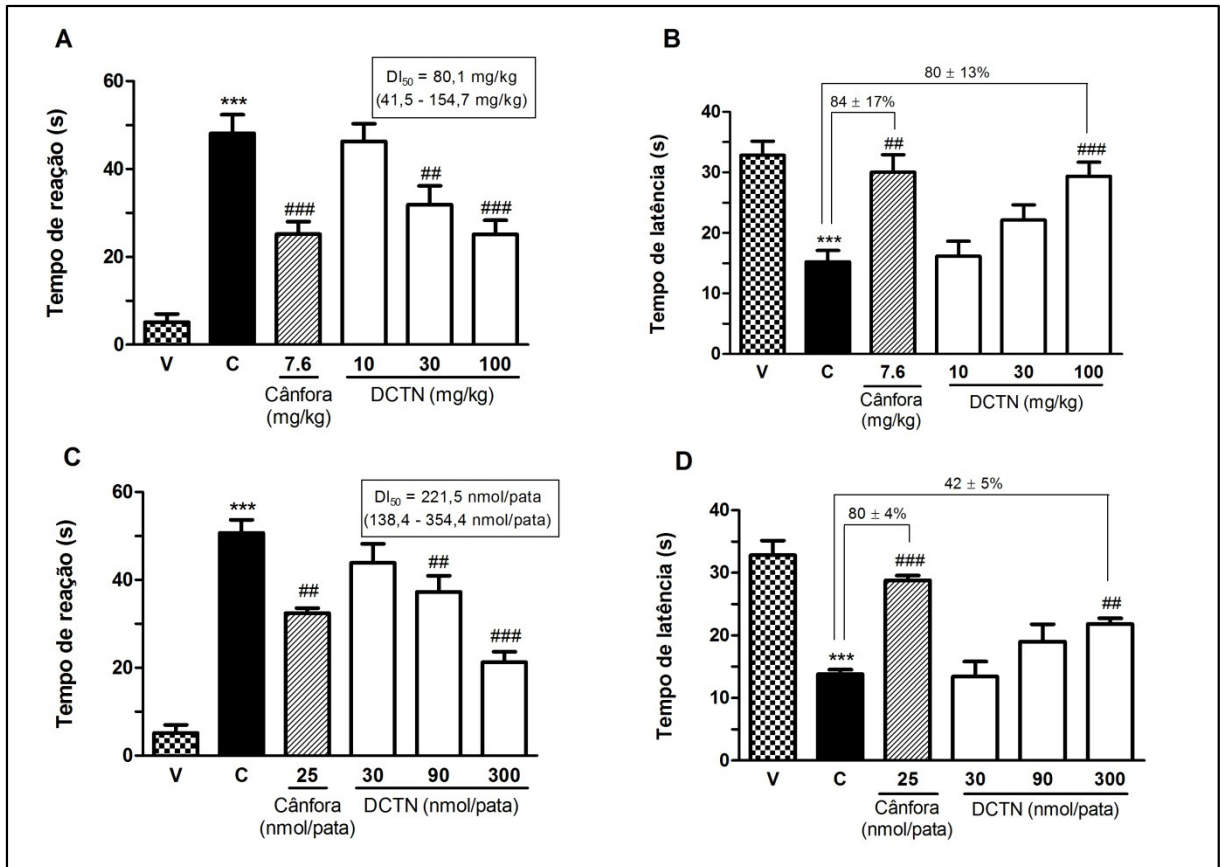


Figura 17 – Efeito da DCTN na nocicepção espontânea e térmica ao frio induzida por cinamaldeído – curva dose-resposta

Efeitos da DCTN administrada por via oral (10 – 100 mg/kg, painéis A e B) ou por via intraplantar (30 – 300 nmol/pata, painéis C e D) ou cânfora (antagonista de canais TRPA1, 7,6 mg/kg, s.c. ou 25 nmol/pata) na nocicepção induzida por cinamaldeído. Os painéis A e C representam a nocicepção espontânea (tempo de lambida da pata) e os painéis B e D representam a sensibilidade ao frio (tempo de latência para retirada da pata na placa fria). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (cinamaldeído i.pl.) e a coluna V indicativa dos valores do grupo veículo i.pl. Os níveis de significância são indicados por \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo veículo (V) e \*\*  $p < 0,01$ ; e ###  $p < 0,001$  quando comparados aos respectivos grupos controle (C) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls). Os valores indicados acima dos símbolos correspondem ao percentual de reversão observado.

### 4.3. Resultados Apresentados nos Experimentos Adicionais

#### 4.3.1. Efeitos Centrais e Periféricos da Dicentrina no Modelo da Formalina

O efeito antinociceptivo da dicentrina em modelos agudos, demonstrado anteriormente pelo modelo do ácido acético, foi confirmado pelo modelo da formalina, no qual foi obtida uma curva da resposta em função da dose. Conforme demonstrado na Figura 18, a DCTN administrada por via oral (30 – 300 mg/kg) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo de modo relacionado à dose na fase inflamatória, com uma  $DI_{50}$  média de 67,3 (44,0 – 102,9) mg/kg e uma inibição máxima de  $95 \pm 3\%$  na dose de 300 mg/kg. Na fase neurogênica, no entanto, apenas a dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de resposta dos animais, sendo esta dose portanto escolhida para experimentos subsequentes.

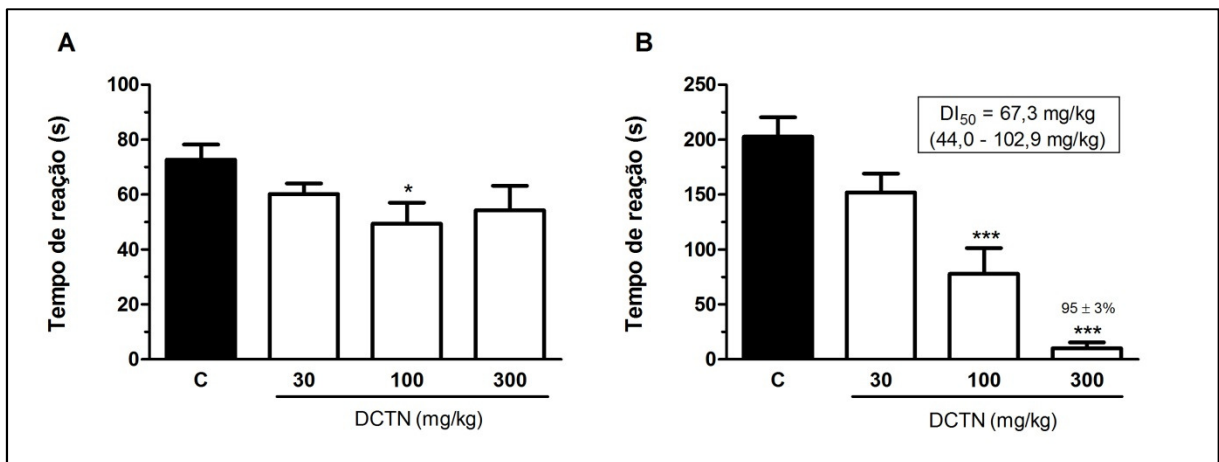


Figura 18 – Efeito da DCTN administrada por via oral na nocicepção induzida por formalina

Efeitos da DCTN (30 – 300 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica (painel A) e na fase inflamatória (painel B) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem às inibições observadas.

Quando administrada por via intraplantar, no entanto, a dicentrina não produziu nenhum efeito antinociceptivo (Figura 19, painéis A e B). Quando administrada centralmente, por via intratecal, a dicentrina apresentou efeito antinociceptivo na fase inflamatória, com uma inibição máxima em torno de 40% (Figura 19, painéis C e D).

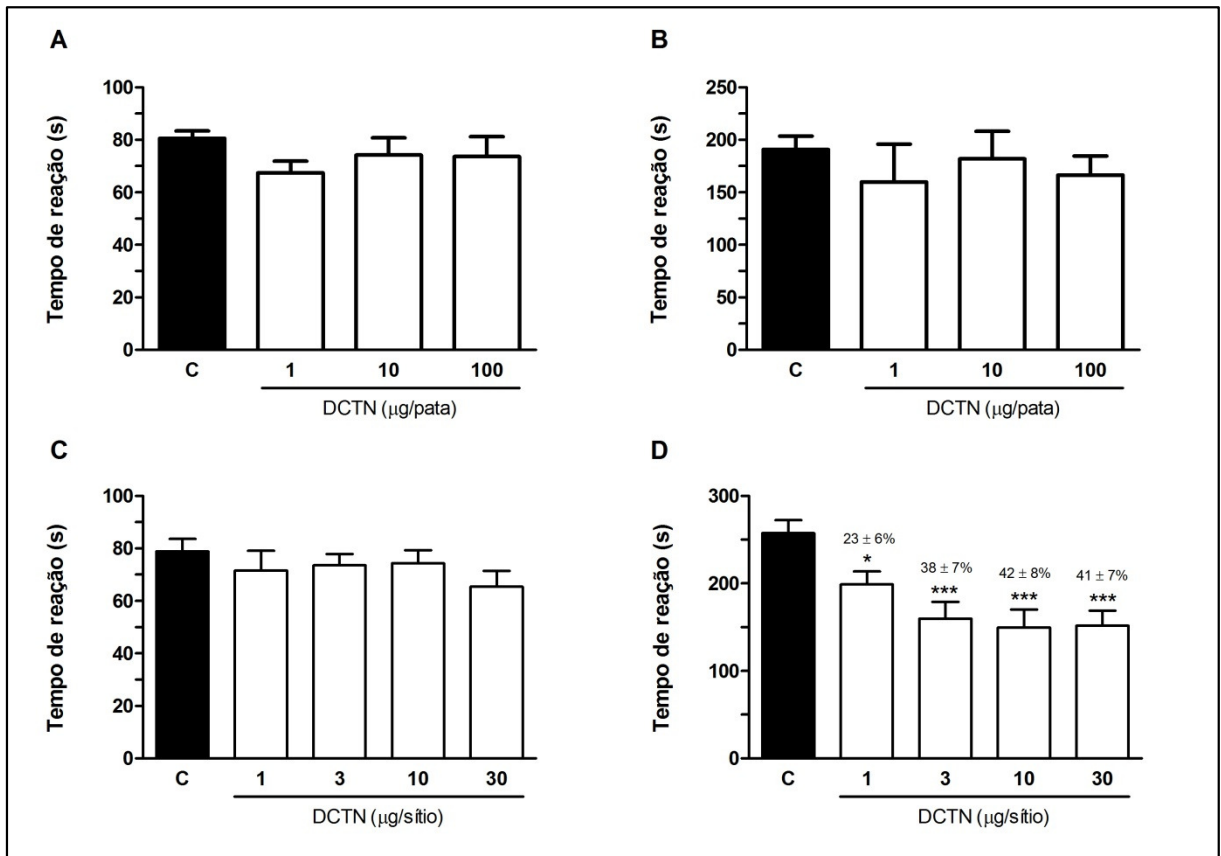


Figura 19 – Efeito da DCTN administrada por via intraplantar e intratecal na nocicepção induzida por formalina

Efeitos da DCTN administrada por via intraplantar (1 – 100 µg/pata) na fase neurogênica (painel A) e na fase inflamatória (painel B) e efeitos da DCTN administrada por via intratecal (1 – 30 µg/sítio) na fase neurogênica (painel C) e na fase inflamatória (painel D) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem às inibições observadas.

#### 4.3.2. Envolvimento dos Sistemas Opióide, Adrenérgico, Canabinóide e Serotonérgico

Conforme demonstrado na Figura 20, o pré-tratamento com o antagonista opióide (naloxona) preveniu o efeito antinociceptivo da morfina, mas não da DCTN, no modelo de nocicepção induzida por formalina. De maneira similar, o pré-tratamento com os antagonistas  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos (prazosina e ioimbina, respectivamente) preveniram os efeitos antinociceptivos da fenilefrina e da clonidina, mas não da DCTN (Figura 21). Os efeitos antinociceptivos da DCTN também não foram prevenidos pelo pré-tratamento com os antagonistas de receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (AM281 e AM630, respectivamente), ao contrário dos agonistas anandamida e win55, 212-2 mesilato (Figura 22). Com relação ao sistema serotonérgico, o tratamento diário com PCPA foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da morfina, mas não da DCTN (Figura 23).

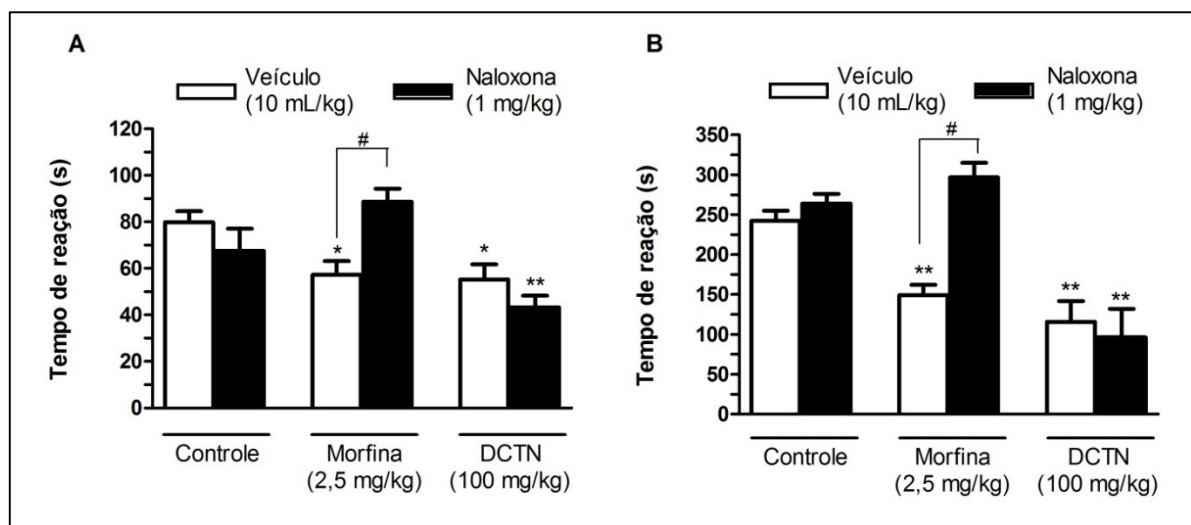


Figura 20 – Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da DCTN

Efeitos do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) no efeito antinociceptivo da DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. O painel A corresponde à fase neurogênica e o painel B corresponde à fase inflamatória do modelo. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o grupo controle e #  $p < 0,05$  quando comparados com o agonista morfina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

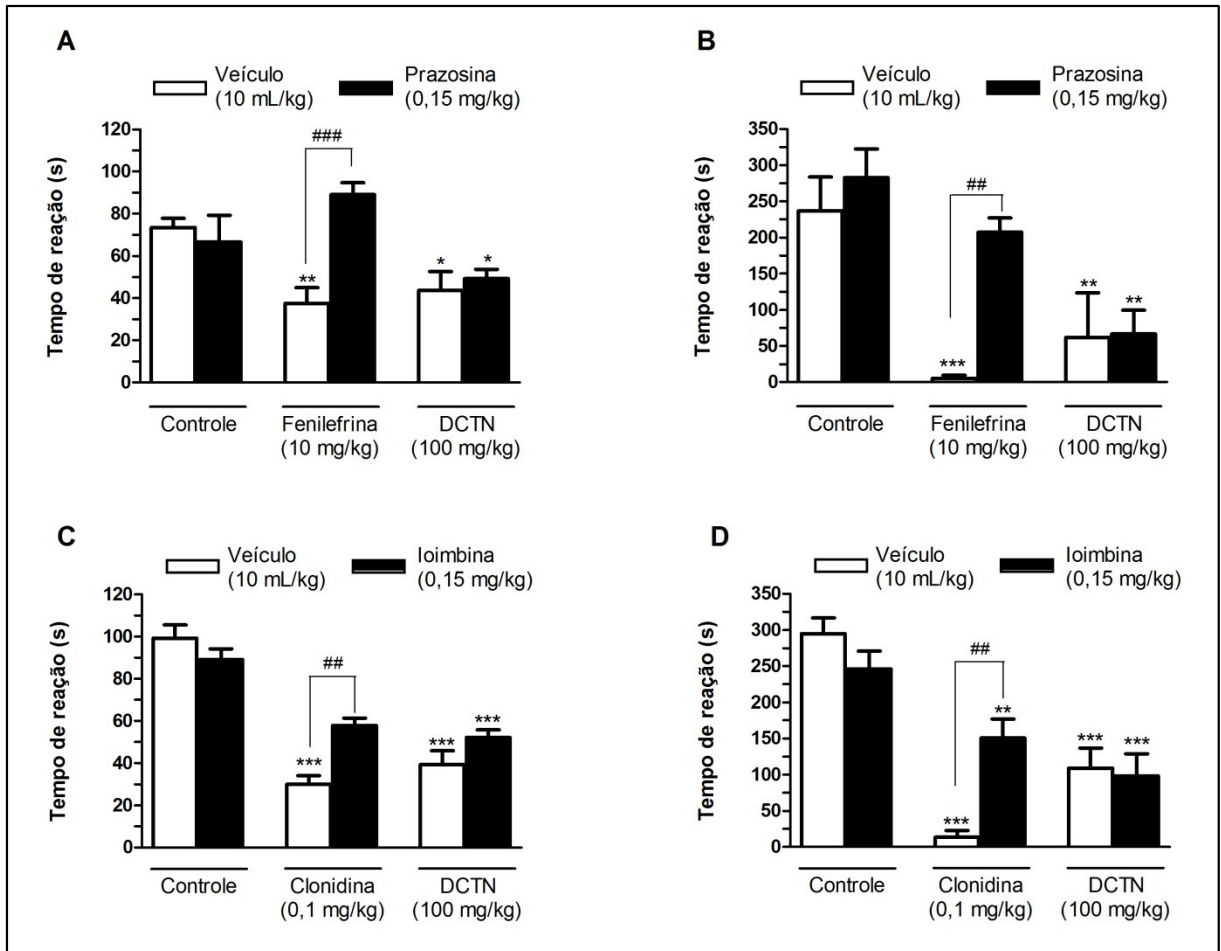


Figura 21 – Envolvimento do sistema adrenérgico no efeito antinociceptivo da DCTN

Efeitos do pré-tratamento com prazosina (0,15 mg/kg, i.p., painéis A e B) ou ioimbina (0,15 mg/kg, i.p., painéis C e D) no efeito antinociceptivo da DCTN (100 mg/kg, v.o.), fenilefrina (10 mg/kg, i.p.) ou clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. Os painéis A e C correspondem à fase neurogênica e os painéis B e D correspondem à fase inflamatória do modelo. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle e ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  quando comparados com os agonistas fenilefrina ou clonidina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

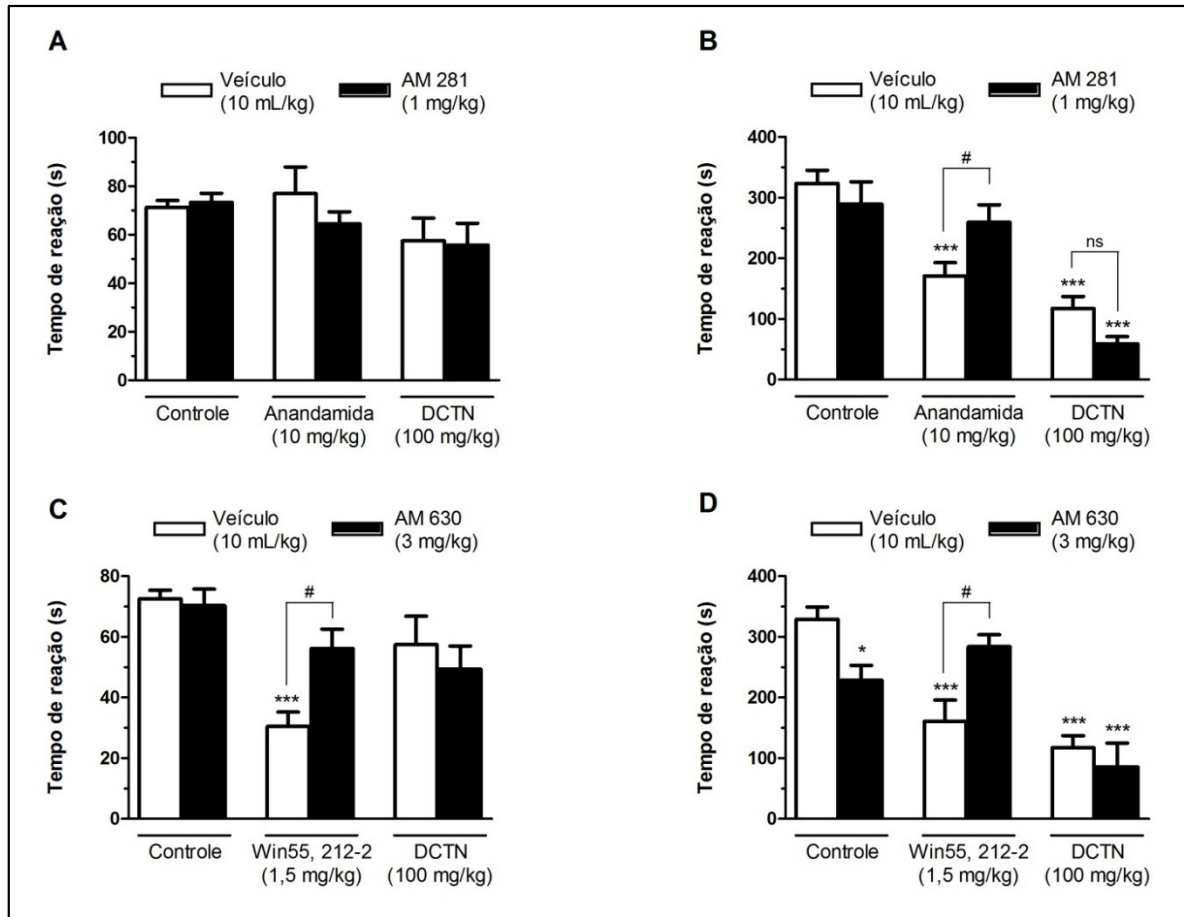


Figura 22 – Envolvimento do sistema canabinóide no efeito antinociceptivo da DCTN

Efeitos do pré-tratamento com AM281 (1mg/kg, i.p., painéis A e B) ou AM630 (3 mg/kg, i.p., painéis C e D) no efeito antinociceptivo da DCTN (100 mg/kg, v.o.), anandamida (10 mg/kg, i.p.) ou win55, 212-2 (1,5 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. Os painéis A e C correspondem à fase neurogênica e os painéis B e D correspondem à fase inflamatória do modelo. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle e #  $p < 0,05$  quando comparados com os agonistas anandamida ou win55, 212-2 (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).



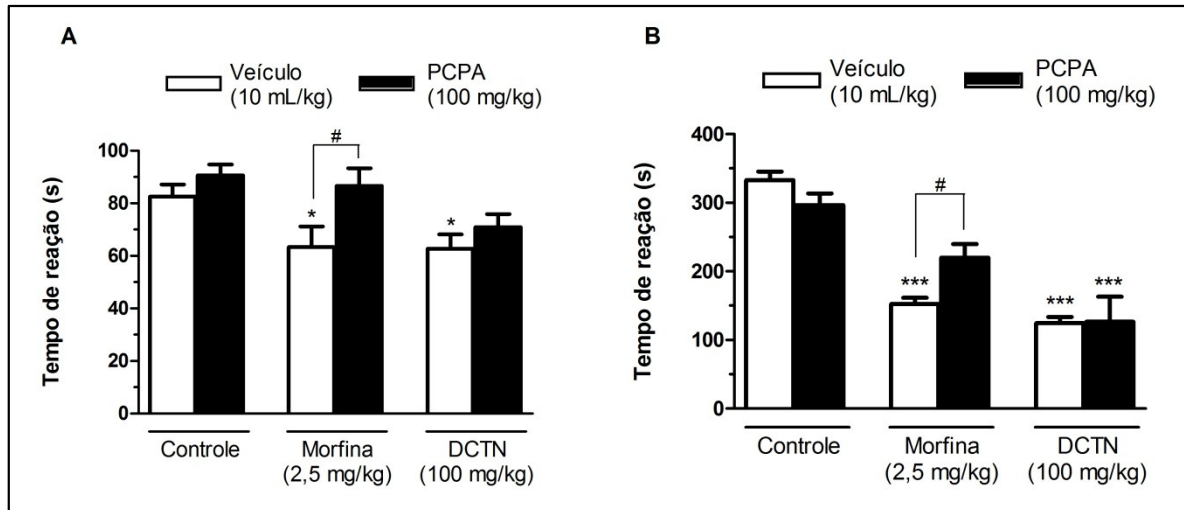


Figura 23 – Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da DCTN

Efeitos do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p., durante 4 dias) no efeito antinociceptivo da DCTN (100 mg/kg, v.o.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. O painel A corresponde à fase neurogênica e o painel B corresponde à fase inflamatória do modelo. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle e #  $p < 0,05$  quando comparados com o agonista morfina (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

#### 4.3.3. Hiperalgisia Induzida por BK, PMA, FSK e PGE<sub>2</sub>

Conforme demonstrado na Figura 24, a injeção intraplantar de bradicinina (3 nmol/pata), PMA (0,1 nmol/pata), forskolina (10 nmol/pata) e prostaglandina E<sub>2</sub> (3 nmol/pata) causou um aumento no percentual de resposta à aplicação dos filamentos de von Frey, caracterizando a indução da hiperalgisia. O pré-tratamento dos animais com DCTN foi capaz de reverter a hiperalgisia induzida pela BK, FSK e PGE<sub>2</sub>, com inibições de  $36 \pm 17\%$ ,  $69 \pm 18\%$  e  $37 \pm 11\%$ , respectivamente, mas não reverteu a hiperalgisia induzida pelo PMA.

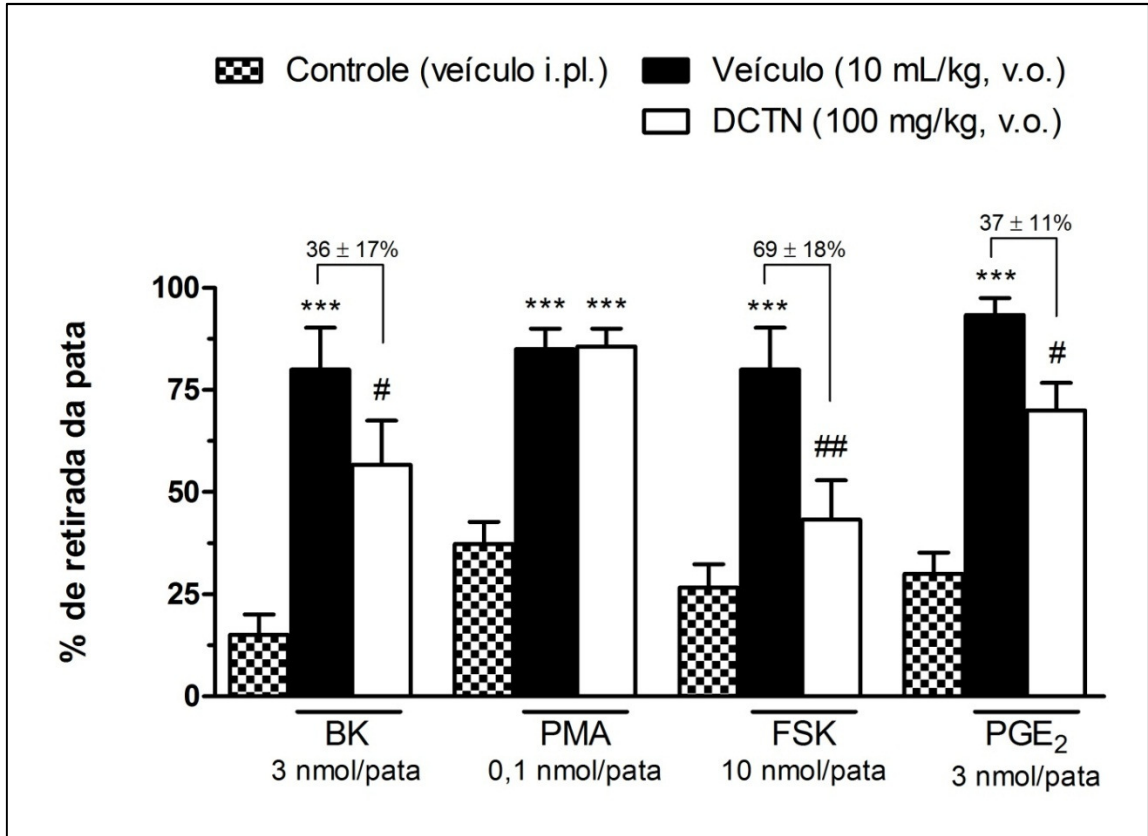


Figura 24 – Efeito da DCTN na hiperalgesia induzida por BK, PMA, FSK e PGE<sub>2</sub>

Efeitos da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hiperalgesia induzida por bradicinina (BK), acetato miristato de forbol (PMA), forskolina (FSK) ou prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais, e os níveis de significância são indicados por \*\*\* p<0,001 quando comparados com o grupo controle (veículo i.pl.) e # p<0,05; e ## p<0,01 quando comparados aos respectivos grupos controle (veículo v.o. + algogênico i.pl.) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem ao percentual de reversão observado.

#### 4.3.4. Envolvimento da Proteína Cinase A (PKA)

##### 4.3.4.1. Nociceção induzida por forskolina

Os resultados ilustrados na Figura 25 demonstram que a forskolina (50 nmol/pata) induziu um comportamento nociceptivo de lambida da pata injetada, o qual foi reduzido em 83 ± 8% pelo pré-tratamento com a dicentrina (100 mg/kg, v.o.).

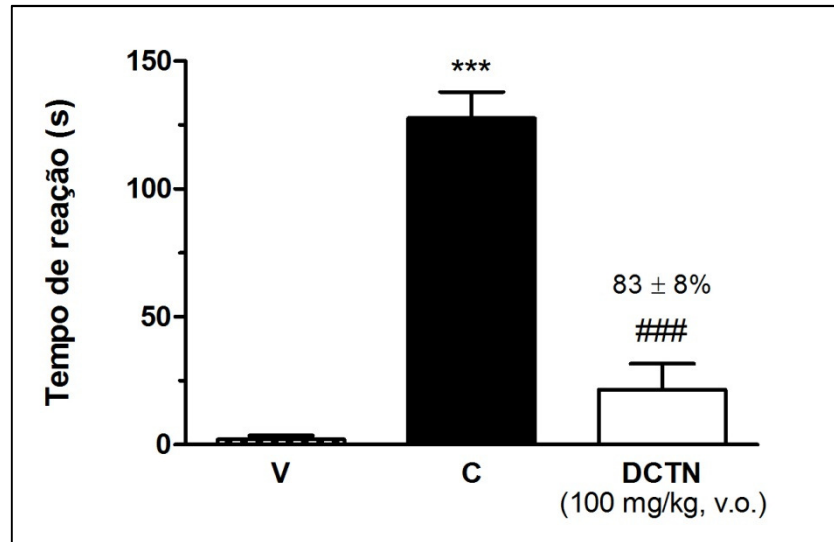


Figura 25 – Efeito da DCTN na nocicepção induzida por FSK

Efeito da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por forskolina. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (forskolina i.pl.) e a coluna V indicativa dos valores do grupo veículo i.pl. Os níveis de significância são indicados por \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo veículo (V) e ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e o valor indicado acima do símbolo corresponde à inibição observada.

#### 4.3.4.2. Ensaio de *western blotting*

Conforme demonstrado na Figura 26, dez minutos após a injeção intraplantar de forskolina ocorreu um aumento das formas fosforiladas de PKA na pata (painéis A, B e C), mas não na medula (painéis D, E e F), sendo que o aumento mais significativo foi da isoforma  $C\beta$  (painel B). O pré-tratamento com a dicentrina (100 mg/kg, v.o.) foi capaz de prevenir o aumento da fosforilação da PKA na pata, com uma diminuição de  $73 \pm 11\%$  na subunidade fosforilada  $C\beta$  (painel B) e de  $87 \pm 12\%$  na p-PKA total (painel C).

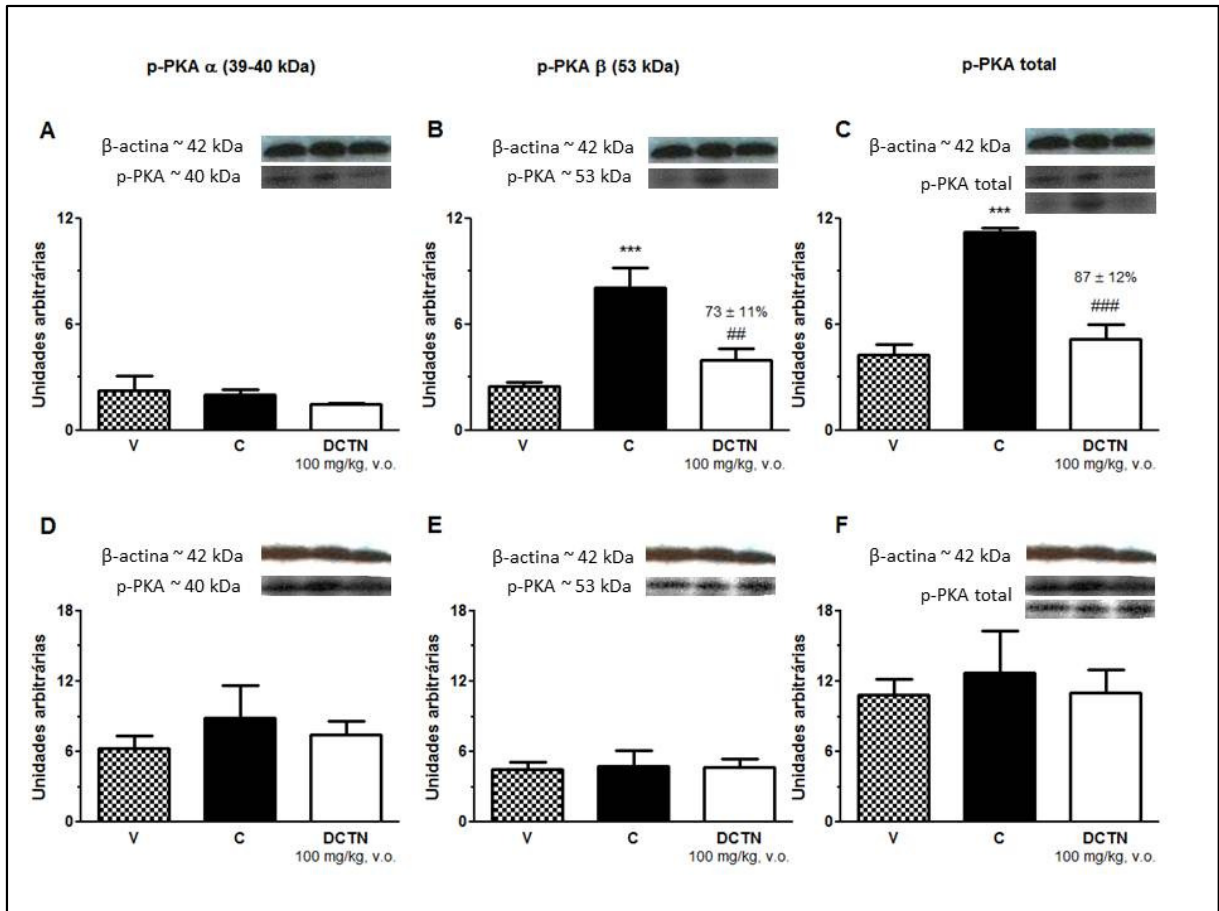


Figura 26 – Efeito da DCTN na ativação da PKA

Efeito da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na ativação/fosforilação da PKA, induzida pela injeção intraplantar de forskolina, na pata (painéis A, B e C) e na medula (painéis D, E e F). Os painéis A e D representam a subunidade catalítica C $\alpha$ , os painéis B e E representam a subunidade catalítica C $\beta$  e os painéis C e F representam a p-PKA total (soma das subunidades C $\alpha$  e C $\beta$ ). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (forskolina i.pl.) e a coluna V indicativa dos valores do grupo veículo i.pl. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo veículo (V) e ##  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem às inibições observadas.

#### 4.3.5. Nocicepção Neuropática Induzida por Ligadura Parcial do Nervo Ciático

A hipersensibilidade mecânica foi avaliada por meio de filamentos de von Frey, iniciando-se no sétimo dia após a LPNC e estendendo-se por mais 14 dias (até o 21<sup>o</sup> dia pós-operatório). Conforme ilustrado na Figura 27, a LPNC induziu uma diminuição do limiar de retirada da pata em relação aos grupos *naïve* e falso-operado. A DCTN (100 mg/kg), por sua vez, foi capaz de reverter essa

hipersensibilidade, aumentando o limiar de retirada da pata em relação ao grupo tratado apenas com veículo. O efeito máximo da DCTN ocorreu uma hora após o tratamento por via oral e foi mantido enquanto a DCTN era administrada uma vez ao dia, até o 11º dia. Quando o tratamento foi interrompido por dois dias, a hipersensibilidade foi novamente observada. Quando o tratamento foi restaurado, no 14º dia, a DCTN novamente foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata, com uma resposta em função do tempo bastante similar ao observado no primeiro dia de tratamento.

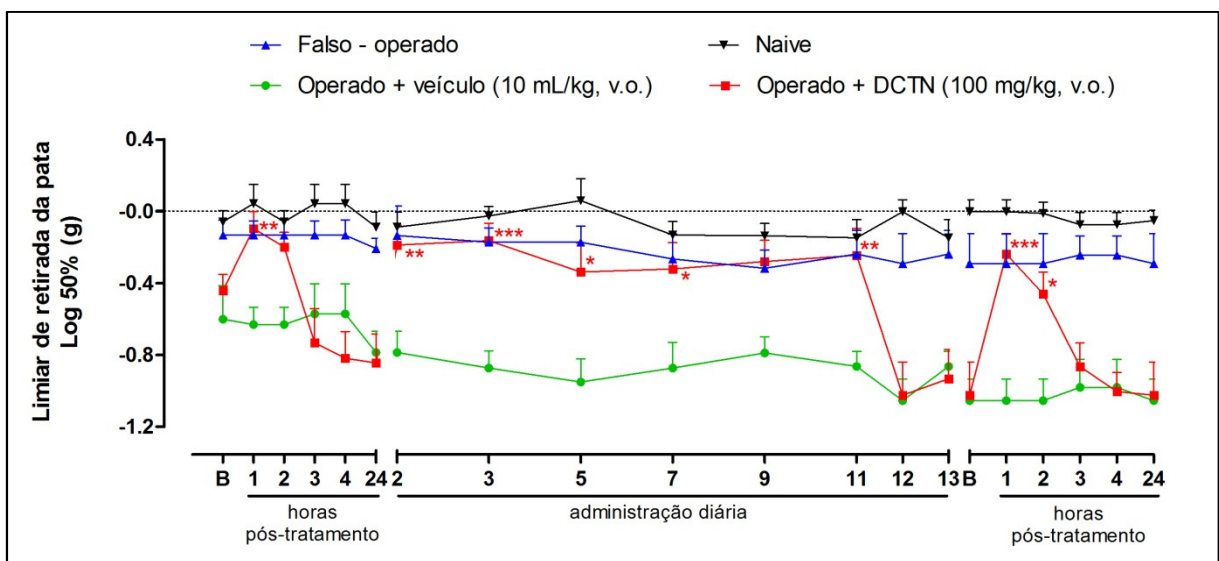


Figura 27 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC

Efeito da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC. No 1º e no 14º dias, as avaliações correspondem aos tempos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas após o tratamento com DCTN, e as demais avaliações correspondem ao tempo de 1h após o tratamento. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo operado + veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

A hipersensibilidade ao frio foi avaliada no 8º e no 15º dia após o início das avaliações (15º e 22º dias pós-operatório, respectivamente) e, conforme apresentado na Figura 28, a DCTN (100 mg/kg) foi capaz de reduzir as respostas à acetona uma hora após sua administração, com inibições de  $80 \pm 20\%$  e  $59 \pm 8\%$ , respectivamente, quando comparado à resposta basal do grupo.

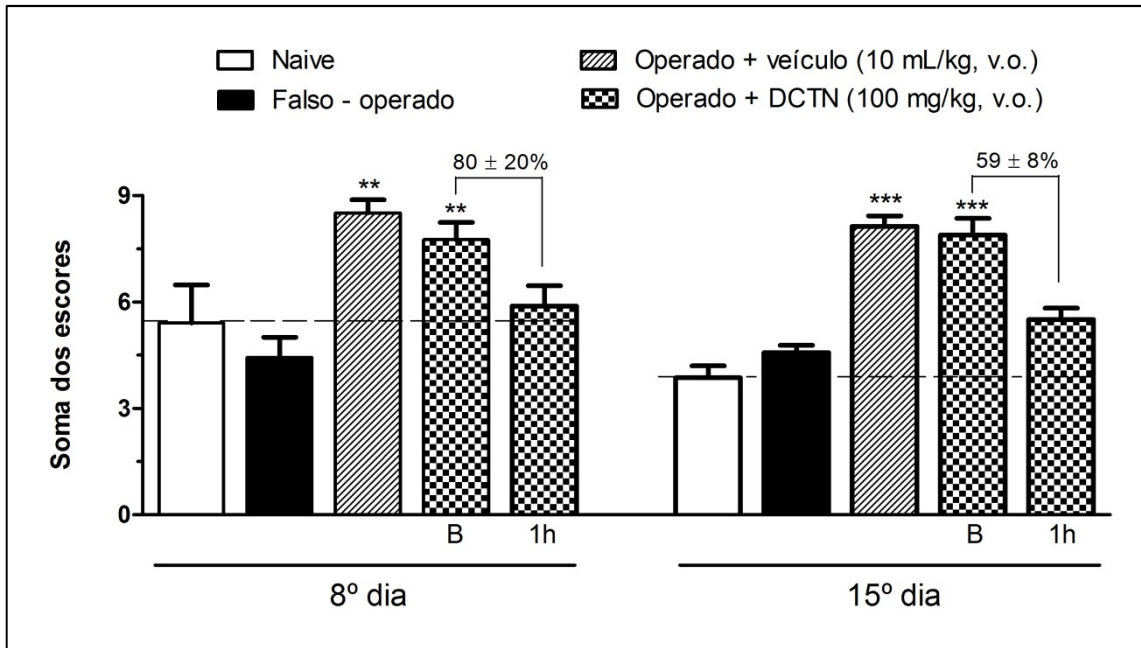


Figura 28 – Efeito da DCTN na hipersensibilidade ao frio induzida pela LPNC

Efeitos da DCTN (100 mg/kg, v.o.) na hipersensibilidade ao frio induzida pela LPNC. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo *naive* (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) e os valores indicados acima dos símbolos correspondem ao percentual de reversão observado.

#### 4.3.6. Efeitos Inespecíficos – Atividade Locomotora, Temperatura Corporal, Efeito Sedativo e Efeitos Tóxicos

O tratamento com DCTN (100 mg/kg) durante 14 dias não causou alterações na atividade motora dos animais, sendo que no teste do campo aberto, realizado uma hora após o último tratamento, o número de cruzamentos foi de  $126,8 \pm 8,9$  para o grupo tratado e  $139,1 \pm 12,0$  para o grupo controle. No teste da barra giratória, todos os animais foram capazes de permanecer na barra durante 60 s, não havendo diferença entre o grupo tratado e o grupo controle. Da mesma forma, a temperatura corporal média não foi alterada quando medida antes e uma hora após a administração de DCTN ou veículo.

Um possível efeito sedativo da dicentrina foi avaliado pelo modelo de sedação induzida por cetamina. Conforme ilustrado na Figura 29, o controle positivo diazepam não alterou o tempo de latência, mas foi capaz de aumentar em 109% o

tempo de sedação após uma injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg), em relação ao grupo controle (médias de  $3011,8 \pm 209,7$  s e  $1438,2 \pm 137,5$  s, respectivamente). A DCTN, por outro lado, não alterou nem o tempo de latência e nem o tempo de sedação em relação ao grupo controle.

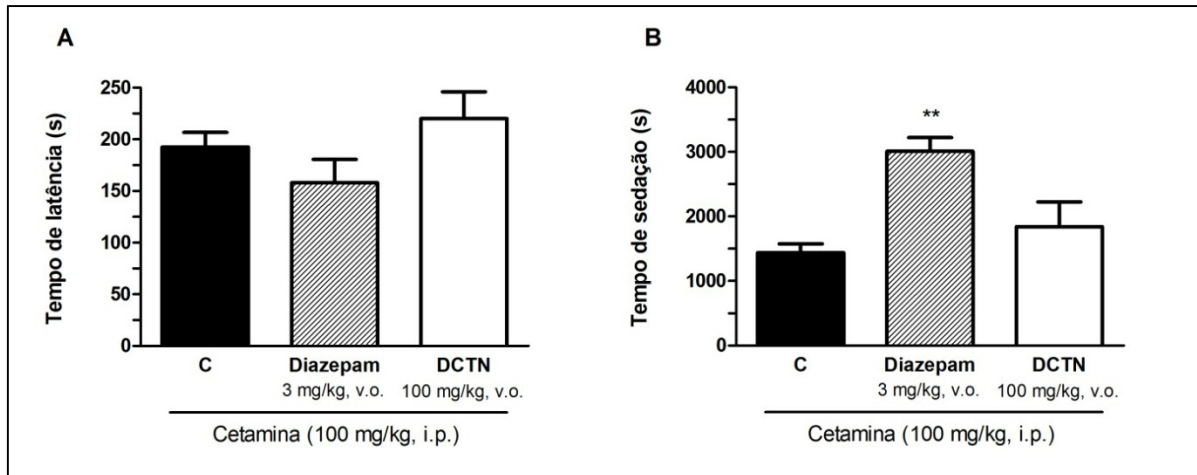


Figura 29 – Efeito da DCTN na potencialização da sedação induzida por cetamina

Efeitos da DCTN (100 mg/kg, v.o.) e diazepam (3 mg/kg, v.o.) no tempo de latência para sedação (painel A) e na duração da ação sedativa (painel B) induzida por cetamina (100 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls).

Com relação a possíveis efeitos deletérios, foram avaliados parâmetros de ganho de peso, peso relativo de órgãos vitais e níveis de enzimas hepáticas após 14 dias de tratamento diário. Não foram observadas diferenças no percentual de ganho de peso entre os grupos tratados com DCTN (100 mg/kg) ou veículo. Com relação ao peso relativo dos órgãos vitais, não foram encontradas diferenças entre os pesos relativos do coração, pulmões, baço e rins entre os grupos (Figura 30, painéis A, B, D e E). Entretanto, o grupo tratado com a DCTN apresentou um aumento no peso relativo do fígado, em relação ao grupo controle (Figura 30, painel C). Porém, quando medidos os níveis de enzimas hepáticas, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis sanguíneos de AST, ALT e  $\gamma$ -GT entre os grupos (Tabela 3).

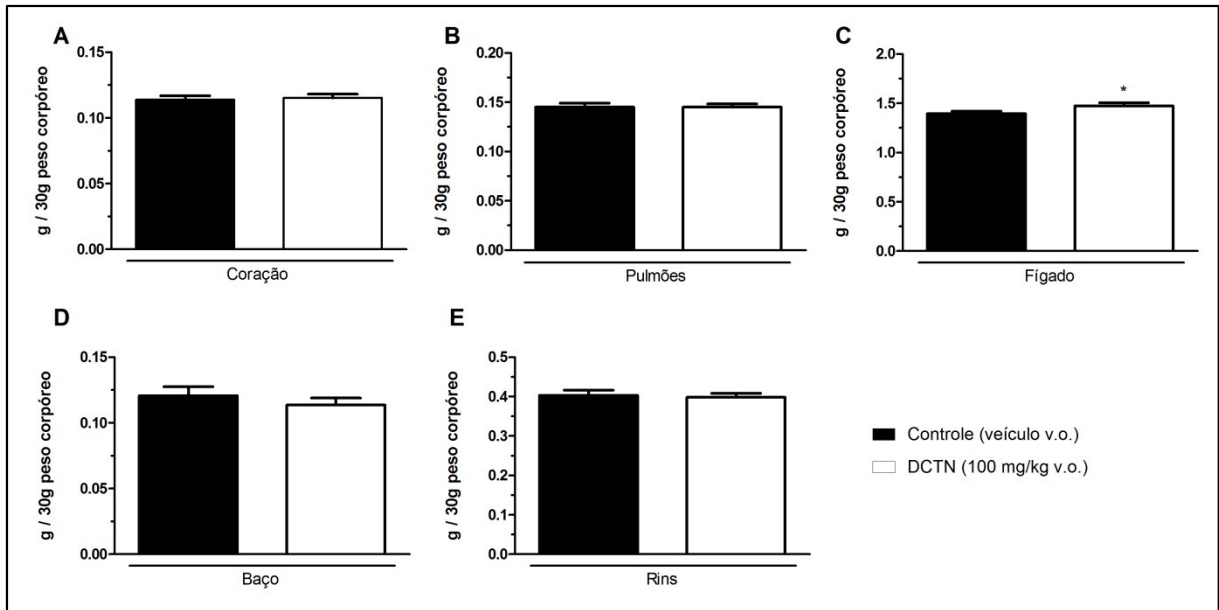


Figura 30 – Efeito da administração diária de DCTN no peso relativo de órgãos vitais

Efeitos da DCTN (100 mg/kg, v.o.) administrada diariamente (14 dias) no peso relativo de órgãos vitais. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 animais. Os níveis de significância são indicados por \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (Teste t de Student).

Tabela 3 – Efeito da administração diária de veículo ou DCTN, durante 14 dias, nos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas

Enzimas	Concentração média no soro (U/L)	
	Grupo Controle	Grupo DCTN
AST	54.96 $\pm$ 5.18	57.34 $\pm$ 13.09
ALT	49.37 $\pm$ 5.54	40.66 $\pm$ 4.24
$\gamma$ -GT	23.27 $\pm$ 4.35	22.40 $\pm$ 1.16

Dados expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 5 a 7 animais (grupos controle e DCTN, respectivamente).

Teste t de Student, nenhuma diferença estatística entre os grupos.



## 5. DISCUSSÃO

De maneira geral, a dor pode ser considerada um sinal de alerta do organismo frente a situações potencialmente danosas. Por outro lado, aparece também como um sintoma associado a diversos estados patológicos e, quando persistente, caracteriza os quadros de dor crônica, por sua vez responsáveis pela diminuição da capacidade produtiva e da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

A busca por terapias eficazes e seguras para o controle da dor passa por diversos campos, como por exemplo, as terapias manuais, o exercício físico e a acupuntura. No entanto, os medicamentos ainda constituem a base da terapia contra a dor, de modo que esta área da pesquisa científica busca o reconhecimento de substâncias com potencial analgésico, que possam ser utilizadas no desenvolvimento de fármacos potentes e seguros.

Neste sentido, partindo de observações iniciais a respeito do potencial efeito antinociceptivo de algumas espécies do gênero *Ocotea*, somado aos relatos de uso popular da *Ocotea puberula*, e aliado à observação de alguns exemplares dessa espécie na produção de frutos fenotipicamente distintos, com maior produção de alcaloides, este trabalho se propôs a investigar o potencial efeito antinociceptivo do extrato destes frutos, bem como do principal alcaloide presente – a dicentrina.

As primeiras abordagens utilizadas foram de caráter fitoquímico, com o objetivo inicial de caracterizar o extrato dos frutos. Embora a composição fitoquímica das cascas e folhas desta espécie seja conhecida, sendo composta por óleo essencial, esteroides/triterpenos, saponinas, taninos e diversos alcaloides em quantidades variáveis (ARAÚJO, 2000; FARAGO, 2002; ZANIN et al., 2011), nenhum relato foi encontrado a respeito da composição fitoquímica dos frutos. Após extração e fracionamento, observou-se que a fração clorofórmica foi a que apresentou maior rendimento bruto, e as análises preliminares apontaram uma grande quantidade de alcaloides nessa fração. Seguindo-se as etapas de isolamento a partir da fração clorofórmica, foi possível obter uma substância na forma de cristais brancos, posteriormente identificada como sendo o alcaloide aporfínico dicentrina. Uma vez que o trabalho de ZANIN et al. (2011) já havia identificado e caracterizado

a presença da dicentrina em diferentes partes da planta, a identificação deste alcaloide, no presente trabalho, se deu por comparação de dados de RMN e características físico-químicas como ponto de fusão e rotação ótica.

De modo geral os alcaloides, assim como outros metabólitos secundários de plantas, são produzidos em vegetais superiores em quantidades pequenas e variáveis, normalmente como moléculas de defesa (SANTOS, 2000). A dicentrina, encontrada também em outras espécies vegetais (principalmente das famílias Menispermaceae, Magnoliaceae e Lauraceae), foi relatada em diferentes partes da *O. puberula*, em pequenas quantidades nas raízes, caules e folhas (ZANIN et al., 2011). No entanto, nos frutos utilizados neste trabalho, chama-nos a atenção o fato de que a dicentrina foi isolada como uma substância majoritária, compondo aproximadamente 57% da fração clorofórmica, quantidade bastante incomum quando se trata de metabólitos secundários. Além disso, outra característica importante é que a dicentrina isolada encontra-se na forma de um enantiômero puro, neste caso a S-(+)-dicentrina. As diferenças isoméricas das moléculas podem dar origem a diferenças na sua atividade biológica, de modo que os diferentes estereoisômeros químicos normalmente apresentam perfis terapêuticos distintos (BERMUDEZ e BARRAGAT, 1996; LIMA, 1997). No entanto, a síntese química de enantiômeros puros apresenta inúmeras dificuldades e custo elevado, de modo que na maioria das vezes são produzidos racematos (misturas contendo os dois enantiômeros). Os racematos, por sua vez, normalmente apresentam características biológicas inferiores aos seus enantiômeros puros (BARREIRO et al., 1997; LIMA, 1997). Neste contexto, os produtos de origem natural apresentam uma vantagem em relação à síntese química, pois os processos biossintéticos oferecem alto grau de estereoseletividade, permitindo às plantas a produção de enantiômeros puros com relativa facilidade (LIMA, 1997). Embora não seja conhecida a quantidade deste alcaloide presente em frutos típicos, acredita-se que seja similar a outras partes da planta. O fato de os frutos utilizados neste trabalho serem fenotipicamente distintos, associado à presença de uma grande quantidade de um enantiômero puro da dicentrina [S-(+)-dicentrina], leva-nos à suposição de que este alcaloide seja produzido como forma de defesa contra alguma agressão, descrita por HIRANO e POSSAMAI (2008) como sendo o ataque da planta pelo fungo *Botryconis pallida*, e que estes frutos atípicos sejam consequência da formação de galhas resultantes do mecanismo de defesa vegetal. Levando em consideração que a dicentrina apresenta

algumas atividades biológicas já descritas, e assumindo sua produção aumentada como um mecanismo natural de defesa, presume-se que o extrato desses frutos tenha alguma atividade biológica importante, aqui pesquisada em termos de possíveis efeitos antinociceptivos.

Os resultados iniciais dessa avaliação são descritos no artigo “Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula* (MONTRUCCHIO et al., 2012), publicado no periódico *Planta Medica* (anexo 1). Além da abordagem fitoquímica, este artigo discute os primeiros resultados de atividade antinociceptiva do extrato utilizado, e já aponta para o importante papel da dicentrina neste efeito.

Para essa abordagem inicial, o modelo da formalina foi utilizado para avaliar a possível atividade antinociceptiva das frações orgânicas obtidas a partir do fracionamento do extrato. A avaliação das frações isoladamente, no lugar do extrato bruto, foi escolhida por permitir traçar uma correlação entre o efeito encontrado e os possíveis grupos de substâncias presentes no extrato, que possam ser responsáveis por tal efeito. O modelo da formalina, por sua vez, foi escolhido devido à sua característica bifásica. Em camundongos, a injeção intradérmica de formalina em concentrações variáveis de 0,5 a 5% causa uma resposta nociceptiva de lambida e/ou mordida da pata injetada, que se inicia imediatamente após a injeção. Esta primeira fase, também chamada de fase neurogênica, é devida a estimulação direta de nociceptores e dura de 3 a 5 minutos, sendo seguida de uma fase quiescente de aproximadamente 10 minutos, na qual o animal não exibe comportamento nociceptivo. A segunda fase, também chamada de fase tardia ou fase inflamatória, inicia-se 15 minutos após a injeção e estende-se até 60 minutos em camundongos. Nesta fase, a nocicepção é resultante tanto de uma resposta inflamatória quanto da sensibilização central no CDME, e pode ser revertida tanto por AINEs quanto por drogas de ação central (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992; BARROT, 2012).

Das frações inicialmente testadas, somente a fração clorofórmica (rica em alcaloides) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina. As frações hexânica (com a presença de esteroides e triterpenos), acetato de etila e residual alcoólica não foram capazes de inibir o comportamento nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina. O fato de o efeito antinociceptivo ser observado somente na fração FC nos sugere que, de alguma forma, tal efeito está diretamente

relacionado aos alcaloides presentes na fração. Sendo a dicentrina o alcaloide majoritário, foi proposta a hipótese de que seria ela a principal responsável pelo efeito antinociceptivo observado na fração FC.

Para confirmação deste efeito, bem como da hipótese de que o mesmo seria decorrente da presença da dicentrina, foi utilizado o modelo do ácido acético, um modelo clássico de dor somato-visceral utilizado na triagem de substâncias com potencial analgésico. A administração intraperitoneal de substâncias irritantes das membranas serosas, neste caso uma solução de ácido acético a 0,6%, provoca um comportamento bastante característico de contração abdominal, associado à extensão das patas traseiras e diminuição da atividade motora. Esses comportamentos são considerados movimentos reflexivos e indicativos de dor abdominal (LE BARS et al., 2001). Este tipo de teste, embora considerado de baixa especificidade, apresenta uma alta sensibilidade e poder preditivo de eficácia clínica, uma vez que as doses efetivas médias ( $DE_{50}$ ) obtidas em roedores geralmente são semelhantes às doses analgésicas médias em humanos (COLLIER et al., 1968; DUBINSKY et al., 1987; LE BARS et al., 2001). Neste modelo, a fração FC foi capaz de reduzir as contorções abdominais características da nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético. De forma semelhante, quando a dicentrina foi administrada por via oral previamente ao teste, ocorreu uma redução do comportamento nociceptivo dos animais. A potência da dicentrina ( $DI_{50} = 75,7$  mg/kg) foi bastante similar à da fração FC ( $DI_{50} = 89,2$  mg/kg), sugerindo portanto que o efeito antinociceptivo do extrato dos frutos de *O. puberula* seja devido à presença da dicentrina. Essas potências são comparáveis à da aspirina, AINE utilizado como droga de referência neste modelo, a qual apresenta uma  $DI_{50}$  de 117,0 mg/kg (VAZ et al., 1996). Já no modelo da formalina, que envolve um componente neurogênico e outro inflamatório, pode-se dizer que a fração FC foi ainda mais eficaz que a aspirina, uma vez que foi capaz de inibir as duas fases da nocicepção, enquanto a droga de referência foi capaz de inibir somente a fase inflamatória. Conjuntamente, estes dados apontam a dicentrina como uma molécula interessante para a investigação do potencial antinociceptivo.

Ainda como avaliação preliminar, foi investigada a possível participação dos sistemas opióide e adenosinérgico no efeito observado da fração FC. No entanto, nenhum dos antagonistas utilizados (naloxona ou cafeína) foi capaz de prevenir o efeito da fração FC, demonstrando que os sistemas opióide e adenosinérgico não

estão envolvidos neste efeito. Além disso, efeitos inespecíficos sobre a atividade motora foram descartados, uma vez que o pré-tratamento com a fração FC não causou nenhuma alteração significativa no teste do campo aberto.

Esses resultados preliminares, demonstrando pela primeira vez um efeito antinociceptivo dos frutos de *O. puberula*, o qual está possivelmente relacionado à presença da dicentrina, levaram ao aprofundamento dessa investigação, focada especificamente neste alcaloide. Os experimentos subsequentes, portanto, foram todos efetuados utilizando a dicentrina isoladamente.

Quando a dicentrina foi administrada previamente ao teste da formalina, observou-se que esta foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo dos animais com um efeito bastante pronunciado na segunda fase, com uma  $DI_{50}$  de 67,3 mg/kg. Considerando seu efeito na fase inflamatória do modelo, o questionamento seguinte foi se a dicentrina seria efetiva em um modelo inflamatório crônico, ou seja, se seria capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica comumente associada aos estados inflamatórios. Os resultados desta avaliação, bem como uma proposta de mecanismo de ação, são descritos no manuscrito intitulado “Antinociceptive effect of dicentrine: evidence for a role of TRPA1 channels”, submetido para publicação (anexo 2).

Os estados inflamatórios normalmente estão associados à dor patológica, e podem ser decorrentes de dano tecidual, de exposição a estímulos químicos ou de processos autoimunes (SCHIENE et al., 2011). Independente da origem da inflamação, este processo envolve a liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas, histamina e fatores de crescimento, os quais por sua vez levam à dor persistente por meio de ativação sustentada e sensibilização de nociceptores primários e de neurônios de ordem superior envolvidos na transmissão do impulso nociceptivo (JULIUS e BASBAUM, 2001; MARCHAND et al., 2005). Esses processos, por sua vez, levam à sensibilização central e à hipersensibilidade, percebidas como hiperalgesia e/ou alodinia (SCHIENE et al., 2011). Neste trabalho, o modelo utilizado para mimetizar um estado inflamatório crônico foi o modelo de inflamação periférica induzida pela injeção intraplantar de CFA, e a hipersensibilidade foi avaliada por meio da aplicação de filamentos de von Frey (no caso da hipersensibilidade mecânica) e dos testes da acetona e placa quente (no caso da hipersensibilidade térmica).

Para a indução do processo inflamatório, o CFA injetado na pata dos animais foi utilizado inicialmente diluído a 50%. A escolha dessa concentração teve por objetivo induzir o processo inflamatório e a hipersensibilidade com o mínimo de dano possível, suficiente apenas para demonstrar o efeito desejado. Esta concentração foi eficaz em desencadear a hipersensibilidade mecânica, caracterizada pela diminuição do limiar de resposta dos animais às aplicações dos filamentos de von Frey. A dicentrina administrada por via oral (100 mg/kg) foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica, aumentando o limiar de resposta dos animais, com efeito máximo em uma hora após sua administração. A hipersensibilidade térmica, tanto ao calor quanto ao frio, também são característicos da resposta inflamatória. O CFA utilizado a 50% induziu a hipersensibilidade ao calor, no entanto, não foi capaz de induzir a hipersensibilidade ao frio nos animais testados, motivo pelo qual outro experimento foi realizado, utilizando o CFA diluído a 80%. Neste caso, além da hipersensibilidade mecânica, o CFA foi capaz de aumentar a resposta dos animais aos estímulos com acetona, caracterizando a hipersensibilidade ao frio, e também foi capaz de diminuir o tempo de latência para retirada da pata na placa quente, uma característica da hipersensibilidade ao calor. A dicentrina, por sua vez, novamente foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica, aumentando o limiar de resposta aos filamentos de von Frey, com ação por até duas horas após sua administração oral. Com relação à hipersensibilidade térmica, por outro lado, a dicentrina foi capaz apenas de diminuir as respostas à acetona, sem alterar o limiar de retirada da pata na placa quente, demonstrando um efeito antinociceptivo frente à hipersensibilidade ao frio, mas não ao calor.

Com relação à percepção térmica tem-se atualmente estabelecido que, entre os sensores de temperatura, os canais TRPV1 e TRPA1 são os principais transdutores dos sinais relativos ao calor e ao frio nocivos, respectivamente. Estes canais são ativados em temperaturas acima de 43°C e abaixo de 17°C, respectivamente (STORY et al., 2003; CORTRIGHT et al., 2007), e sua sensibilização parece ser crucial para o desenvolvimento da hipersensibilidade térmica em situações patológicas (HUANG et al., 2006).

Especificamente com relação aos canais TRPA1, vários estudos tem demonstrado sua importância na transdução da nocicepção ao frio, particularmente em estados fisiopatológicos de hipersensibilidade (STORY et al., 2003; DEL CAMINO et al., 2010). O envolvimento destes canais tem sido demonstrado por meio

de abordagens utilizando a depleção dos canais e animais *knockout*. Alguns estudos demonstram que o tratamento com oligodeoxinucleotídeo *antisense* para TRPA1, que causa a depleção destes canais, reduz o comportamento de hipersensibilidade ao frio após inflamação induzida por CFA, lesão do nervo ciático ou ligadura do nervo espinal na altura de L5, e que camundongos *knockout* para TRPA1 apresentam alteração nas respostas comportamentais quando colocados numa placa fria mantida a 0°C (OBATA et al., 2005; PREMKUMAR e ABOOJ, 2012). Além disso, alguns estudos demonstram que o estímulo frio é capaz de potencializar a ativação dos canais TRPA1 por alilisotiocianato e 4-hidroxinonenal, dado este que corrobora a hipótese de que a hipersensibilidade ao frio seja mediada por TRPA1 em condições inflamatórias (DEL CAMINO et al., 2010; ANDRADE et al., 2012).

Além da sua participação na hipersensibilidade térmica, os canais TRPA1 também estão envolvidos na transdução de estímulos químicos e físicos (PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011). São ativados diretamente por substâncias químicas irritantes como alilisotiocianato, alicina, cinamaldeído e formalina (BANDEL et al., 2004; JORDT et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; McNAMARA et al., 2007), e indiretamente por mediadores inflamatórios como bradicinina e prostaglandinas, sendo, portanto, esperada sua ativação em situações inflamatórias (DA COSTA et al., 2010). De fato, tem sido demonstrado que em condições inflamatórias os canais TRPV1 e TRPA1 são alguns dos principais transdutores da resposta nociceptiva a estímulos mecânicos (BASBAUM et al., 2009; STUCKY et al., 2009), desempenhando um papel bastante relevante no desenvolvimento da dor neurogênica e inflamatória via ativação de fibras sensoriais, tanto em nível central como periférico (FERNANDES et al., 2012). Uma vez que os processos inflamatórios normalmente levam a uma redução do pH e acidez tecidual, os canais TRPV1 podem ser diretamente ativados por prótons presentes no tecido e levar à transmissão nociceptiva, além de participar no desenvolvimento da hipersensibilidade ao calor (REEH et al., 2001). Da mesma forma, os canais TRPA1, além de mediar a hipersensibilidade ao frio associada aos processos inflamatórios (STUCKY et al., 2009), também apresentam um papel importante na transdução de estímulos mecânicos nestas condições. Contudo, o mecanismo exato de sua participação na transmissão nociceptiva não está completamente elucidado (PETRUS et al., 2007; WANG et al., 2008; BASBAUM et al., 2009; KWAN et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado que os canais TRPA1 parecem exercer um

papel bastante relevante na transmissão nociceptiva em modelos inflamatórios como o CFA e a formalina. Tanto o bloqueio farmacológico dos canais TRPA1, utilizando um antagonista seletivo (HC-030031), quanto a deleção gênica desses canais, utilizando animais *knockout*, diminuem de modo significativo as respostas nociceptivas à formalina (McNAMARA et al., 2007; STUCKY et al., 2009) e previnem o desenvolvimento inicial e a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pela injeção de CFA em camundongos (PETRUS et al., 2007; DA COSTA et al., 2010).

Os canais TRPA1 também podem ser ativados/modulados por agonistas endógenos, como produtos de estresse oxidativo (por exemplo, peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonenal), óxido nítrico e agonistas de receptores ativados por protease do tipo 2 (PAR-2), além de substâncias produzidas como resposta a um sinal inflamatório inicial, como a bradicinina e a prostaglandina do tipo 15d-PGJ2, (PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011; ANDRADE et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; PREMKUMAR e ABOOJ, 2012). Alguns destes agonistas endógenos de canais TRPA1 são produzidos e aparecem em níveis elevados em condições inflamatórias. Desta forma, os canais TRPA1 presentes em terminais nervosos são superativados, contribuindo de maneira significativa para a hipersensibilidade, tanto mecânica quanto térmica ao frio, associada aos estados de dor crônica (JIANG et al., 2011; PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011; ANDRADE et al., 2012).

Levando em consideração o efeito antinociceptivo da dicentrina nos modelos agudos do ácido acético e da formalina, sua capacidade de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio no modelo do CFA, e considerando ainda que os canais termo-sensíveis TRPV1 e TRPA1 estão envolvidos na hipersensibilidade associada aos processos inflamatórios crônicos, o passo seguinte foi investigar a participação destes canais no efeito antinociceptivo da dicentrina. Para esta abordagem, foi utilizado um modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de agonistas seletivos de canais TRPV1 (capsaicina) e TRPA1 (cinamaldeído), utilizando antagonistas destes canais como controles positivos. Ao contrário do AMG9810, um antagonista seletivo de canais TRPV1, a dicentrina não foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela capsaicina. Por outro lado, quando administrada por via oral (100 mg/kg) ou por via intraplantar (100 µg/pata, equivalente a 300 nmol/pata), a dicentrina reduziu o comportamento de lambida da pata injetada com cinamaldeído de modo semelhante à cânfora, um antagonista de canais TRPA1. Embora haja diferenças no estímulo e no modo de ativação, os



canais ativados por capsaicina (TRPV1) e cinamaldeído (TRPA1) são os mesmos ativados por calor e frio nocivos, respectivamente. Sendo assim, estes resultados vão ao encontro daqueles obtidos no modelo do CFA, onde a dicentrina reduziu a hipersensibilidade ao frio, mas não ao calor. Considerando ainda que os canais TRPA1 estão também envolvidos na hipersensibilidade mecânica no modelo do CFA, estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo da dicentrina pode ser decorrente de alguma interação com canais TRPA1, porém sem interferir com os canais TRPV1. Partindo dessa hipótese, foi desenhado um novo experimento utilizando a injeção intraplantar de cinamaldeído como ativador de canais TRPA1. Os animais foram tratados com diferentes doses de dicentrina, tanto por via oral (uma hora antes da injeção de cinamaldeído) quanto por via intraplantar (coinjetada com o cinamaldeído), e foram avaliados dois parâmetros nociceptivos: o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata injetada e o tempo de latência para a retirada da pata na placa fria ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Como resultado, observou-se que a dicentrina administrada por via oral foi capaz de reduzir o comportamento de lambida da pata injetada e também de aumentar o tempo de latência na placa fria, ambos de maneira relacionada à dose e com inibições semelhantes ao controle positivo cânfora. Quando administrada localmente, por via intraplantar, a dicentrina também reduziu o comportamento de lambida da pata de modo relacionado à dose, com inibição semelhante à cânfora nas doses utilizadas, enquanto na sensibilidade ao frio, demonstrada pelo tempo de latência na placa fria, a dicentrina administrada localmente também foi capaz de aumentar o tempo de latência, porém de modo menos eficaz que a cânfora.

Comparando as vias de administração utilizadas, também se observa uma diferença na ação da dicentrina de acordo com o parâmetro observado. Na nocicepção induzida diretamente pela ativação dos canais pelo cinamaldeído, caracterizada pelo tempo de lambida da pata, as doses utilizadas por via oral (10 – 100 mg/kg) e por via intraplantar (10 – 100  $\mu\text{g/pata}$ , equivalente a 30 – 300 nmol/pata) produziram um efeito antinociceptivo com potências semelhantes: a maior dose utilizada por via oral (100 mg/kg) produziu uma inibição de  $52 \pm 6\%$  enquanto a maior dose utilizada por via intraplantar (100  $\mu\text{g}$  ou 300 nmol/pata) produziu uma inibição de  $58 \pm 5\%$  no comportamento nociceptivo. Quando comparadas as vias de administração no parâmetro da placa fria, no entanto, essa relação não foi observada: a maior dose utilizada por via oral (100 mg/kg) produziu

uma reversão de  $80 \pm 4\%$  enquanto a maior dose utilizada por via intraplantar (100  $\mu\text{g}$  ou 300 nmol/pata) produziu uma reversão de  $42 \pm 5\%$  no tempo de latência, praticamente a metade da eficácia observada por via oral.

A diferença na efetividade de drogas, dependente da via de administração, pode ser decorrente de diversos fatores. No caso dos canais TRPA1, por exemplo, possíveis diferenças no modo de ativação desses canais dependendo do estímulo (químico, mecânico ou térmico), além da localização e da quantidade de canais “alcançados” por uma droga antagonista, são fatores que podem interferir no seu efeito antinociceptivo. Quando administrada sistemicamente, uma droga tende a se “espalhar” por diversos sítios, podendo alcançar uma extensão maior de canais do que quando administrada localmente. Sabe-se que os canais TRPA1 são expressos em neurônios sensoriais do GRD, do GN e do GT, e seu papel na detecção periférica de diversos estímulos nocivos é bem estabelecido, uma vez que a aplicação periférica de agonistas de canais TRPA1 leva à ativação de fibras aferentes de pequeno diâmetro, causando dor e hiperalgesia, que são revertidos pela aplicação periférica de antagonistas destes canais (STORY et al., 2003; DA COSTA et al., 2010; KLAFKE et al., 2012). Entretanto, o papel dos canais TRPA1 na transmissão nociceptiva em nível espinal ainda não é tão bem estabelecido (KOSUGI et al., 2007; KLAFKE et al., 2012). Os canais TRPA1 são expressos não apenas nas terminações distais, mas também nas terminações centrais das fibras nociceptivas aferentes primárias, localizadas no CDME (KOSUGI et al., 2007; PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011). Nas terminações centrais, acredita-se que a ativação de canais TRPA1 facilite a liberação de glutamato, aumentando a frequência e a amplitude da transmissão glutamatérgica do sinal aferente aos neurônios do corno dorsal, devido a um mecanismo que envolve o influxo de cálcio no terminal nociceptivo via canais TRPA1 (KOSUGI et al., 2007; PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011). Alguns estudos têm demonstrado a participação espinal dos canais TRPA1 na nocicepção e no desenvolvimento da hipersensibilidade. DA COSTA e colaboradores (2010) demonstraram que a administração intratecal de pequenas doses de um antagonista seletivo de canais TRPA1 foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e ao frio em animais injetados com CFA. Além disso, a inflamação neurogênica induzida pela injeção intradérmica de óleo de mostarda também é atenuada por pequenas doses de antagonistas TRPA1 administrados intratecalmente (WEI et al., 2010). Conjuntamente, e considerando ainda que

diversas situações sustentadas de nocicepção são associadas com aumento da produção de agonistas endógenos de TRPA1 (PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011), e que a própria microglia espinal produz agonistas endógenos de TRPA1 em algumas situações de lesão (KIM et al., 2010), estes dados dão suporte à proposta de que a ativação sustentada de fibras nociceptivas primárias pode contribuir para o aumento da transmissão dos sinais nociceptivos via canais TRPA1 presentes nos terminais centrais (PERTOVAARA e KOIVISTO, 2011). Sendo assim, drogas capazes de bloquear esses canais em nível central, quando administradas por via sistêmica tenderiam a apresentar um efeito antinociceptivo mais pronunciado do que quando administradas localmente.

Há que se levar em conta, no entanto, que a transmissão nociceptiva se dá de maneiras diferentes quando os canais TRPA1 ativados estão localizados nas terminações periféricas ou centrais. O bloqueio de canais TRPA1 centrais, em nível espinal, diminui predominantemente a hipersensibilidade a estímulos mecânicos de baixa intensidade, enquanto o bloqueio de canais TRPA1 periféricos reduz o comportamento nociceptivo frente a estímulos mecânicos nocivos, de alta intensidade (KERSTEIN et al., 2009; WEI et al., 2011).

Conforme descrito anteriormente, os presentes resultados demonstraram que a eficácia da dicentrina em reduzir o comportamento de lambida da pata injetada com cinamaldeído foi similar quando administrada por via oral ou intraplantar. Por outro lado, quando administrada por via intraplantar, a eficácia em diminuir a sensibilidade na placa fria foi aproximadamente a metade daquela observada quando a dicentrina foi administrada por via oral. Extrapolando os dados dos estudos citados para estes resultados, pode-se sugerir que esta diferença de ação frente ao estímulo frio seja devida ao fato de que, quando administrada sistemicamente, a dicentrina pode atingir uma extensão maior de canais TRPA1, em sítios muito distintos daqueles atingidos quando administrada perifericamente.

Coletivamente, portanto, os resultados apresentados no manuscrito “Antinociceptive effect of dicentrine: evidence for a role of TRPA1 channels”, demonstram que a dicentrina possui um importante efeito antinociceptivo em modelos inflamatórios, reduzindo a nocicepção espontânea e revertendo a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, possivelmente por meio de uma interação direta com canais TRPA1. Embora os resultados comportamentais apontem para essa interação, outras abordagens como estudos *in vitro*, ensaios

moleculares de ligação, ou análises imunohistoquímicas de expressão de canais TRPA1 constituem abordagens importantes para confirmar se essa interação se dá diretamente nos canais, ou se ocorre indiretamente, via cascatas de sinalização intracelular.

Os resultados discutidos até aqui permitem algumas conclusões iniciais, a destacar: 1) o extrato dos frutos de *Ocotea puberula* apresenta um efeito antinociceptivo que parece ser devido à presença da dicentrina; 2) a dicentrina apresenta um importante efeito antinociceptivo em modelos agudos e crônicos, principalmente de caráter inflamatório; e 3) o mecanismo de ação da dicentrina parece envolver uma interação direta com canais TRPA1. Na sequência, são discutidas algumas observações adicionais sobre o efeito da dicentrina em outros modelos de nocicepção, outros possíveis mecanismos de ação e uma análise preliminar sobre possíveis efeitos inespecíficos e/ou tóxicos.

O modelo da formalina foi novamente utilizado, com o objetivo de avaliar a ação periférica e central da dicentrina, e para tanto foram utilizadas as vias de administração intraplantar e intratecal. Conforme discutido anteriormente, a dicentrina administrada por via oral reduziu o comportamento nociceptivo de lambida da pata injetada, na segunda fase, com uma  $DI_{50}$  de 67,3 mg/kg e uma inibição de  $95 \pm 3\%$  na maior dose utilizada (300 mg/kg). Quando coinjectada com a formalina, no entanto, a dicentrina não produziu nenhum efeito antinociceptivo. Por outro lado, quando administrada por via intratecal, mesmo a menor dose utilizada (1  $\mu$ g/sítio) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo na segunda fase do modelo, com inibição de  $23 \pm 6\%$ . As doses de 3, 10 e 30  $\mu$ g/sítio também foram eficazes, contudo não diferiram entre si, apresentando inibições de  $38 \pm 7\%$ ,  $42 \pm 8\%$  e  $41 \pm 7\%$ , respectivamente. Estes resultados demonstram que, no modelo da formalina, a dicentrina administrada por via intratecal apresenta efeito antinociceptivo com uma inibição máxima em torno de 40%, menor do que quando administrada sistemicamente, onde a inibição pode chegar a 95%. Porém, não apresenta nenhum efeito quando administrada por via intraplantar. Considerando que um dos mecanismos pelos quais a formalina induz a nocicepção é pela ativação de canais TRPA1 (McNAMARA et al., 2007; STUCKY et al., 2009), e levando em conta a proposta de que a dicentrina possa agir bloqueando as respostas mediadas por TRPA1, era esperado que dicentrina administrada por via intraplantar apresentasse efeito antinociceptivo no modelo da formalina, assim como foi observado na

nocicepção induzida por cinamaldeído. Essa diferença, no entanto, pode ser explicada pela complexidade dos sistemas ativados pela injeção intraplantar de formalina: as duas fases do modelo são qualitativamente diferentes, ativadas por diferentes vias e possivelmente refletem diferentes mecanismos de nocicepção (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). A primeira fase resulta da ativação direta das fibras aferentes primárias e liberação de neuropeptídeos excitatórios como a Substância P e CGRP, tanto nos terminais centrais quanto nos terminais periféricos, enquanto a segunda fase é resultante também da resposta inflamatória e da sensibilização central no CDME (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992; PUIG e SORKIN, 1996). Diversos estudos têm demonstrado que a nocicepção mediada pela formalina envolve vários mecanismos, por exemplo, a ativação de canais iônicos como TRPA1 e ASICs, ativação e translocação de PKC em neurônios do corno dorsal, e liberação de vários mediadores, como prostaglandinas, bradicinina, óxido nítrico, citocinas e glutamato (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; TJØLSEN et al., 1992; YASHPAL et al., 1995; SWEITZER et al., 2004; McNAMARA et al., 2007). Além disso, a injeção de formalina também leva à ativação microglial e ao aumento da fosforilação da MAPK p38, aumentando a excitabilidade de neurônios nociceptivos no corno dorsal (FU et al., 1999; SVENSSON et al., 2003; LI et al., 2010). Essa diversidade de mecanismos envolvidos na nocicepção induzida pela formalina justifica o fato de a dicentrina apresentar um efeito variável, dependente da via de administração. Quando administrada localmente, somente o bloqueio de canais TRPA1 não seria suficiente para diminuir a nocicepção induzida pela formalina, devido à diversidade de respostas envolvidas neste efeito. Por outro lado, quando administrada sistemicamente, além do proposto bloqueio das respostas mediadas por canais TRPA1, a dicentrina poderia atuar também em outros pontos das cascatas de sinalização e segundos mensageiros envolvidos nas respostas nociceptivas. Neste sentido, portanto, foram investigados também outros possíveis mecanismos de ação deste alcaloide.

Sabe-se que as sensações de dor podem ser modificadas por sistemas descendentes inibitórios endógenos, como por exemplo, os sistemas adrenérgico, serotoninérgico, opióide e canabinóide, via liberação de substâncias como noradrenalina, serotonina, opióides e canabinóides endógenos, respectivamente. A ativação destes sistemas modifica a liberação de glutamato das fibras aferentes

primárias e a liberação de GABA e glicina, alterando a transmissão da informação nociceptiva aos centros superiores e, desta forma, reduzindo a intensidade da percepção dolorosa (MILLAN, 2002; YOSHIMURA e FURUE, 2006). Alguns estudos sugerem que a dicentrina possa ter um efeito antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (TENG et al., 1991; YU et al., 1992; YU et al., 1993) e, sendo assim, foi investigada a possível participação deste sistema no efeito antinociceptivo da dicentrina.

Os receptores adrenérgicos são divididos em duas classes:  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo os receptores do tipo  $\alpha$  subdivididos em  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva. As fibras aferentes primárias expressam tanto receptores do tipo  $\alpha_1$ - quanto  $\alpha_2$ -adrenérgicos, ambos capazes de mediar ações periféricas da noradrenalina, que por sua vez é capaz de mediar as respostas nociceptivas (PERTOVAARA, 2006). Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos são acoplados à proteína  $G_{q/11}$ , e sua ativação leva à abertura de canais de  $Ca^{2+}$ , aumentando a liberação de neurotransmissores e a ativação de PLC. Já os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são acoplados à proteína  $G_{i/o}$ , e sua ativação promove a abertura de canais de  $K^+$  e diminuição da condutância de  $Ca^{2+}$ , resultando em hiperpolarização da membrana e/ou diminuição da liberação de neurotransmissores. Desta forma, de modo geral os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos apresentam um efeito excitatório, enquanto os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos apresentam um efeito inibitório na transmissão sensorial (YOSHIMURA e FURUE, 2006). No entanto, a literatura demonstra alguns dados controversos a respeito da contribuição específica dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos na transmissão nociceptiva. Vários dados suportam a idéia de que os receptores do tipo  $\alpha_2$  podem ter um papel pró-nociceptivo (KHASAR et al., 1995; TRACEY et al., 1995; LEE et al., 1999; BANIK et al., 2001), enquanto outros sugerem o contrário, que os receptores do tipo  $\alpha_2$  teriam um papel inibitório no desenvolvimento da dor e os receptores do tipo  $\alpha_1$  teriam um papel facilitatório, uma vez que antagonistas  $\alpha_1$  (mas não antagonistas  $\alpha_2$ ) são capazes de diminuir a hipersensibilidade de nociceptores periféricos após lesão nervosa ou inflamação neurogênica (ALI et al., 1999; LEE et al., 1999; BAIK et al., 2003; REN et al., 2005). Considerando essa diversidade de dados, pode-se imaginar que os receptores do tipo  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  possam ter respostas diferentes, dependendo do local onde são ativados, de modo que ambos podem levar à antinocicepção.

A abordagem clássica para a investigação do envolvimento de sistemas descendentes de controle da dor no mecanismo de ação de possíveis substâncias analgésicas, em modelos animais, consiste no pré-tratamento com antagonistas de receptores dos diferentes sistemas envolvidos, seguido do tratamento com a droga em teste ou com os respectivos agonistas, previamente a um modelo de nocicepção. Neste trabalho foi utilizado o modelo da formalina e, conforme descrito na sessão de resultados, nem a prazosina (antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos) e nem a ioimbina (antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo da dicentrina, ao contrário do observado para os controles positivos fenilefrina (agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos) e clonidina (agonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos). Além disso, a prazosina *per se*, como antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, não foi capaz de causar nenhum efeito antinociceptivo neste modelo, mesmo quando administrada numa dose dez vezes maior que a habitual (dado não mostrado). Estes resultados demonstram que o efeito antinociceptivo da dicentrina não está relacionado ao seu suposto efeito antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Outro dado que corrobora esta afirmação é o fato de que em uma parcela de fibras C e A $\delta$ , os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos são coexpressos com canais TRPV1 (DAWSON et al., 2011) e a hiperalgesia induzida pela injeção de capsaicina em ratos é mediada por estes receptores (KINNMAN e LEVINE, 1995). Dados eletrofisiológicos de fibras C e A $\delta$  demonstram ainda, que a sensibilização de nociceptores das fibras aferentes primárias, induzida pela capsaicina, pode ser substancialmente reduzida pelo bloqueio periférico de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (REN et al., 2005). Sendo assim, caso o efeito antinociceptivo da dicentrina fosse devido à modulação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, seria esperado que fosse capaz de diminuir as respostas nociceptivas no modelo da injeção intraplantar de capsaicina, fato que não foi observado neste trabalho.

Na sequência, foram avaliados também os sistemas opióide, canabinóide e serotoninérgico, porém nenhum dos antagonistas utilizados (naloxona, AM281, AM630 ou PCPA, sendo este último não um antagonista, mas um inibidor da síntese de serotonina) foi capaz de reverter o efeito da dicentrina, demonstrando que seu efeito antinociceptivo também não é devido a interações com estes sistemas de controle descendente.

Além destes sistemas clássicos de modulação, deve-se considerar ainda que a transmissão nociceptiva pode envolver diversas outras vias de sinalização, mediadas por segundos mensageiros. As lesões teciduais levam à liberação de diversos mediadores químicos, os quais podem ativar diretamente os nociceptores, ou podem ainda modular diferentes vias de sinalização intracelular, levando à transmissão nociceptiva (JULIUS e BASBAUM, 2001). Tais mediadores, incluindo aminoácidos excitatórios, peptídeos, prótons e citocinas, ao se ligarem a seus receptores específicos, ativam cascatas de sinalização mediadas por proteínas cinases como PKA e PKC, além da proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) e das MAPKs (OTUKI et al., 2005; PINTO et al., 2008). As proteínas cinases, as quais constituem uma das maiores famílias de genes codificados pelo genoma humano, apresentam um importante papel regulatório em diversas funções das células eucarióticas, incluindo a divisão celular, crescimento, diferenciação e morte celular, além de participar da regulação de vias envolvidas em memória e nocicepção (TAYLOR et al., 2008). De fato, alguns estudos demonstram que a nocicepção induzida por carragenina, formalina e ácido acético pode ser revertida por inibidores ou por deleção gênica de PKA e/ou PKC (MALMBERG et al., 1997; KHASAR et al., 1999).

Dentro da superfamília das proteínas cinases, a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) é uma das mais bem compreendidas. A PKA constitui o principal alvo do AMPc, um dos segundos mensageiros intracelulares mais abundantes, e sua ativação é responsável pela regulação de funções como o crescimento e diferenciação celular, condutividade de canais iônicos, liberação sináptica de neurotransmissores e transcrição gênica (SKALHEGG e TASKÉN, 1997; DOLAN e NOLAN, 2001; TAYLOR et al., 2008). A PKA é uma holoenzima tetramérica, formada por duas subunidades regulatórias (RI e RII) e duas subunidades catalíticas (C), sendo conhecidas três isoformas de C, amplamente expressas em tecidos neuronais e não-neuronais: C $\alpha$ , C $\beta$  e C $\gamma$  (SKALHEGG e TASKÉN, 1997; TAYLOR et al., 2008). As subunidades regulatórias servem como receptoras de AMPc, apresentando dois duplos sítios de ligação ao AMPc na região carboxi-terminal (SKALHEGG e TASKÉN, 1997). A ligação do AMPc às subunidades regulatórias da PKA leva à liberação das subunidades catalíticas, que uma vez livres, são capazes de fosforilar seus substratos proteicos em resíduo de serina e treonina. Tais substratos, alvos da fosforilação por PKA, incluem canais iônicos e proteínas associadas à liberação de



neurotransmissores e aminoácidos excitatórios. Alguns estudos demonstram que a PKA é capaz de fosforilar canais de cálcio e receptores de glutamato, incluindo as subunidades NR1 dos receptores NMDA e as subunidades GluR1 de receptores AMPA, evidenciando, portanto, a importância da PKA no processamento nociceptivo (SKALHEGG e TASKÉN, 1997; DOLAN e NOLAN, 2001; PINTO et al., 2008; TAYLOR et al., 2008).

A via de sinalização AMPc/PKA pode ser ativada por um grande número de diferentes receptores, que uma vez ativados por seus ligantes, transduzem o sinal da superfície celular por meio de interação com proteínas G (SKALHEGG e TASKÉN, 1997). Um exemplo deste tipo de ativação pode ser observado com a PGE<sub>2</sub>, um dos principais mediadores inflamatórios liberados no sítio de lesão tecidual. Os receptores E para prostanóides (EP), acoplados a uma proteína G<sub>s</sub>, uma vez ativados pela PGE<sub>2</sub> levam à ativação da via de sinalização AMPc/PKA (TAIWO e LEVINE, 1991; MALMBERG et al., 1997; ALEY e LEVINE, 1999; MILLAN, 1999; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009). A injeção periférica de PGE<sub>2</sub> leva a hiperalgesia e alodinia por sensibilização dos terminais periféricos das fibras aferentes primárias, e essa hipersensibilidade parece ser mediada pela via AMPc/PKA, uma vez que a resposta nociceptiva induzida pela PGE<sub>2</sub> é reduzida pela inibição da PKA. Além disso, a forskolina, um ativador da adenilato ciclase (AC) que por sua vez aumenta os níveis de AMPc, é capaz de aumentar a hipersensibilidade mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (TAIWO e LEVINE, 1991; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009).

Em neurônios nociceptivos primários, o aumento do AMPc é associado à ativação da PKA. Uma vez que os ativadores da AC são capazes de aumentar a hipersensibilidade mecânica, enquanto tanto os inibidores do AMPc quanto os inibidores da PKA são capazes de reverter a hipersensibilidade induzida por PGE<sub>2</sub>, pode-se concluir que a PKA participa efetivamente no desenvolvimento da hipersensibilidade induzida por este mediador inflamatório (MALMBERG et al., 1997; ALEY e LEVINE, 1999; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009). ALEY e LEVINE (1999) demonstram ainda que, embora todas as etapas da cascata do AMPc sejam necessárias para a indução da hipersensibilidade por PGE<sub>2</sub>, cerca de cinco minutos após a indução essa hipersensibilidade é mantida apenas pela atividade da PKA, não sendo mais necessária a atividade da AC, demonstrando que a atividade da PKA é fundamental para a manutenção da dor inflamatória. De modo

geral, portanto, a PKA está envolvida no processamento nociceptivo tanto em nível central quanto periférico, e não existem evidências que impliquem isoformas específicas das subunidades catalíticas da PKA no processamento nociceptivo (MALMBERG et al., 1997).

Além da PKA, outra cinase bastante envolvida no processamento nociceptivo é a PKC (SACHS et al., 2009). As PKCs compõem uma família de cinases de serina/treonina e são divididas em três grupos: 1) as PKCs convencionais, representadas pelas isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ; 2) as novas PKCs, representadas pelas isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ; e 3) as PKCs atípicas, representadas pelas isoformas  $\xi$  e  $\lambda$ /I. As isoformas relacionadas à transmissão nociceptiva são aquelas já identificadas nas fibras aferentes primárias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\xi$ ) e nas lâminas superficiais do CDME ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$ ) (VELÁZQUEZ et al., 2007). A ativação da via da PKC está relacionada aos efeitos nociceptivos causados por diversos estímulos, incluindo mediadores inflamatórios como a bradicinina, endotelinas e adrenalina, sendo capaz de fosforilar componentes celulares como enzimas, canais iônicos e receptores de membrana (FERREIRA et al., 2005; SACHS et al., 2009). Alguns estudos demonstram que a ativação da PKC está associada à sensibilização de nociceptores em resposta à bradicinina, carragenina e histamina, uma vez que inibidores da PKC são capazes de inibir a nocicepção induzida por estes agentes (TAIWO e LEVINE, 1991; FERREIRA et al., 2005). A bradicinina, por exemplo, agindo via receptores B2, leva à ativação da via PLC/PKC, despolarização dos terminais sensoriais e sensibilização das fibras sensoriais a outros estímulos, tanto nocivos quanto inócuos, caracterizando a hipersensibilidade (JULIUS e BASBAUM, 2001; FERREIRA et al., 2004).

Alguns estudos demonstram ainda que a ativação de PKC leva também à fosforilação de canais TRPV1, aumentando sua sensibilidade à ativação por capsaicina, uma vez que inibidores da PKC são capazes de prevenir a fosforilação e ativação destes canais (PREMKUMAR e AHERN, 2000; BHAVE et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; MEOTTI et al., 2006). Outro dado que aponta para a importância desta proteína cinase no processamento nociceptivo é o fato de que ativadores da PKC, como o PMA, quando injetados periféricamente produzem nocicepção espontânea e hipersensibilidade térmica e mecânica em camundongos. Essas respostas nociceptivas estão associadas à translocação da PKC do citosol para a membrana das fibras aferentes primárias, indicando que a sua ativação está

implicada na nocicepção periférica (FERREIRA et al., 2005; VELÁZQUEZ et al., 2007).

De modo geral, a via da PKC também parece ser fundamental para o desenvolvimento da sensibilização periférica em fibras aferentes primárias, resultando posteriormente na hipersensibilidade térmica. Após uma lesão, a PKC parece aumentar a neurotransmissão excitatória e diminuir o tônus inibitório na sinapse dos aferentes primários no corno dorsal. Além disso, as isoformas  $\alpha$  e  $\epsilon$  parecem mediar a nocicepção periférica, enquanto a isoforma  $\gamma$  parece ser importante na nocicepção central (VELÁZQUEZ et al., 2007).

Considerando a importância da PKA e da PKC na transmissão nociceptiva e no desenvolvimento da hipersensibilidade após lesão tecidual, em especial do tipo inflamatória, foi investigado na sequência se o efeito antinociceptivo da dicentrina poderia ser devido à modulação destas vias. Para tanto, foi utilizado um modelo de hipersensibilidade mecânica induzida pela injeção intraplantar de ativadores das cascatas mediadas por PKA ( $PGE_2$  e forskolina) e por PKC (bradicinina e PMA). Como resultado, foi observado que o pré-tratamento com a dicentrina foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica induzida pela  $PGE_2$  e pela forskolina e, embora tenha reduzido as respostas induzidas pela bradicinina, a dicentrina não foi capaz de reduzir a hipersensibilidade induzida pelo PMA. Embora a bradicinina ative primariamente a via da PLC/PKC, alguns dados na literatura indicam que a ativação de PKA também ocorre após a ativação dos receptores B2. Possivelmente, a ativação da PLC leva a um aumento na concentração intracelular de cálcio, que por sua vez ativa a AC, levando à produção de AMPc e ativação da PKA (LIEBMANN e BOHMER, 2000; WANG et al., 2008). Desta forma, os resultados apresentados sugerem que a dicentrina pode exercer seu efeito antinociceptivo por modulação da via da PKA. Para confirmar esta hipótese foram realizados ensaios de *western blotting* para verificar a ativação da PKA. Conforme descrito na sessão de resultados, a injeção intraplantar de FSK induziu o aumento da ativação da PKA na pata, observada como uma elevação nos níveis das subunidades catalíticas fosforiladas da PKA, e esse aumento foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com a dicentrina. Além disso, considerando que a subunidade C $\alpha$  possui peso molecular de 40 kDa, diferente da subunidade C $\beta$  que possui 53 kDa, foi possível observar também que a subunidade C $\beta$  parece ser a mais relacionada com a nocicepção induzida pela FSK, e sua ativação foi prevenida pela pré-administração

da dicentrina por via oral. Estes resultados sugerem, portanto, que um dos mecanismos pelos quais a dicentrina exerce seu efeito antinociceptivo é a inibição da ativação da via AMPc/PKA, envolvendo principalmente a subunidade C $\beta$  da PKA.

Outra questão importante a ser observada em relação ao mecanismo de ação da dicentrina é o fato de que em condições inflamatórias, mediadores como a BK e a PGE<sub>2</sub> podem indiretamente ativar canais TRPA1, via cascatas de segundos mensageiros e proteínas cinases (BAUTISTA et al., 2006; DA COSTA et al., 2010). WANG e colaboradores (2008) demonstraram uma interação funcional entre os receptores B2 e os canais TRPA1, sugerindo que a BK pode potencializar as respostas dos canais TRPA1 por um mecanismo dependente da via da PKA e da ativação da PLC, porém independente da ativação da PKC. Nessa proposta, a ativação da PLC, aumentando a concentração intracelular de cálcio, por sua vez estimulando a produção de AMPc e a ativação da PKA, seria um mecanismo importante de sensibilização dos canais TRPA1 (LIEBMANN e BOHMER, 2000; WANG et al., 2008). Dentro deste contexto, os dados obtidos neste trabalho apontam fortemente para os canais TRPA1 e a via AMPc/PKA como pontos de atuação da dicentrina para a produção de seu efeito antinociceptivo.

Assim como demonstrado no modelo de nocicepção crônica de origem inflamatória, a dicentrina administrada por via oral também foi efetiva em diminuir a hipersensibilidade mecânica e ao frio no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo ciático. A sensibilização central envolvida nestes dois tipos de dor crônica é dependente, entre outros mecanismos, da ativação de proteínas cinases como a PKA e a PKC, e dados na literatura demonstram que esse processamento é diferente dependendo da origem da lesão (MALMBERG et al., 1997; LEVY e STRASSMAN, 2002; YAJIMA et al., 2003). De modo geral, a via da PKA estaria envolvida na sensibilização central em situações inflamatórias, enquanto a via da PKC seria a mais relevante na hipersensibilidade decorrente de lesão nervosa, sendo que a lesão no nervo ciático leva a um aumento da atividade da PKC no CDME (MAO et al., 1992; MALMBERG et al., 1997; YAJIMA et al., 2003; VELAZQUEZ et al., 2007).

Algumas evidências, no entanto, apontam também para a participação da PKA no desenvolvimento da hipersensibilidade associada a estados neuropáticos. A lesão nervosa produz descargas ectópicas persistentes, que por sua vez aumentam a liberação de glutamato nos terminais centrais dos aferentes primários,

aumentando a excitabilidade (GAO et al., 2005). Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA parecem ser os mais envolvidos na dor persistente, sendo que a fosforilação da subunidade NR1 está relacionada ao aumento da transmissão sináptica e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da sensibilização central (WOOLF e THOMPSON, 1991; ZHUO, 2002. GAO et al., 2005). No modelo de neuropatia causada pela ligadura do nervo espinal, GAO e colaboradores (2005) demonstram que a fosforilação das subunidades NR1 dos receptores NMDA é dependente da ativação da PKA, e que o H89, um inibidor da PKA, é capaz de reverter a alodinia mecânica induzida pela ligadura do nervo. Em outro modelo neuropático, induzido pelo paclitaxel, CHEN e colaboradores (2011) demonstram que inibidores da PKA são efetivos em reduzir a hipersensibilidade térmica e mecânica. Alguns estudos demonstram ainda que a lesão nervosa induz um aumento persistente de PGE<sub>2</sub>, que por sua vez leva ao aumento da síntese de BDNF em neurônios do GRD, contribuindo para a sensibilização central e manutenção da dor no modelo de LPNC, sendo que inibidores da PKA são capazes de reduzir o aumento de BDNF dependente de PGE<sub>2</sub> em cultura de neurônios do GRD (SCHAFERS et al., 2004; MA et al., 2010; DUARTE et al., 2012). Em conjunto, estes dados demonstram que a ativação da PKA também está envolvida na hipersensibilidade mecânica encontrada nas neuropatias, podendo explicar o efeito da dicentrina no modelo da LPNC.

Finalmente, com relação a possíveis efeitos inespecíficos e/ou deletérios da dicentrina, foram observados alguns parâmetros relacionados à atividade motora, temperatura corporal, ganho de peso, peso relativo de alguns órgãos vitais e enzimas hepáticas, além da avaliação de um possível efeito sedativo da dicentrina. O tratamento diário dos animais com a dicentrina por via oral, durante 14 dias, não alterou os parâmetros de locomoção no campo aberto nem tampouco a temperatura corporal, parâmetros que caso alterados podem interferir no comportamento nociceptivo dos animais. Um possível efeito sedativo também poderia interferir no comportamento dos animais, levando a erros na interpretação dos dados, de modo que este efeito também foi avaliado. No modelo utilizado, foi observado que a dicentrina não alterou o tempo de sedação induzido pela cetamina, ao contrário do controle positivo diazepam. Diante destes dados, pode-se dizer que o efeito antinociceptivo da dicentrina não é decorrente destes efeitos inespecíficos.

Com relação a possíveis efeitos tóxicos, foi observado que a dicentrina administrada diariamente não alterou o percentual de ganho de peso dos animais em relação ao grupo controle, nem tampouco alterou o peso relativo de órgãos vitais como coração, baço, rins e pulmões. No entanto, o grupo tratado com a dicentrina apresentou um aumento estatisticamente significativo no peso relativo do fígado, em relação ao grupo controle. Sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos, de modo que substâncias potencialmente tóxicas tendem a causar alterações neste órgão, principalmente relacionadas aos níveis de enzimas hepáticas. Em virtude dessa observação, foram avaliados os níveis sanguíneos das enzimas AST, ALT e  $\gamma$ -GT após 14 dias de tratamento diário com a dicentrina, e os resultados demonstraram que não houve alteração dos níveis enzimáticos em relação ao grupo controle, demonstrando certo nível de segurança. No entanto, estes resultados sobre toxicidade são apenas preliminares, de modo que estudos mais aprofundados serão necessários caso a dicentrina venha a ser efetivamente explorada para fins terapêuticos.

Coletivamente, os resultados apresentados demonstram que a dicentrina possui um importante efeito antinociceptivo em modelos agudos e crônicos, tanto de origem inflamatória quando neuropática, e tal efeito parece ser mediado por interação com canais TRPA1 e com a via de sinalização AMPc/PKA, conforme ilustrado na Figura 31.

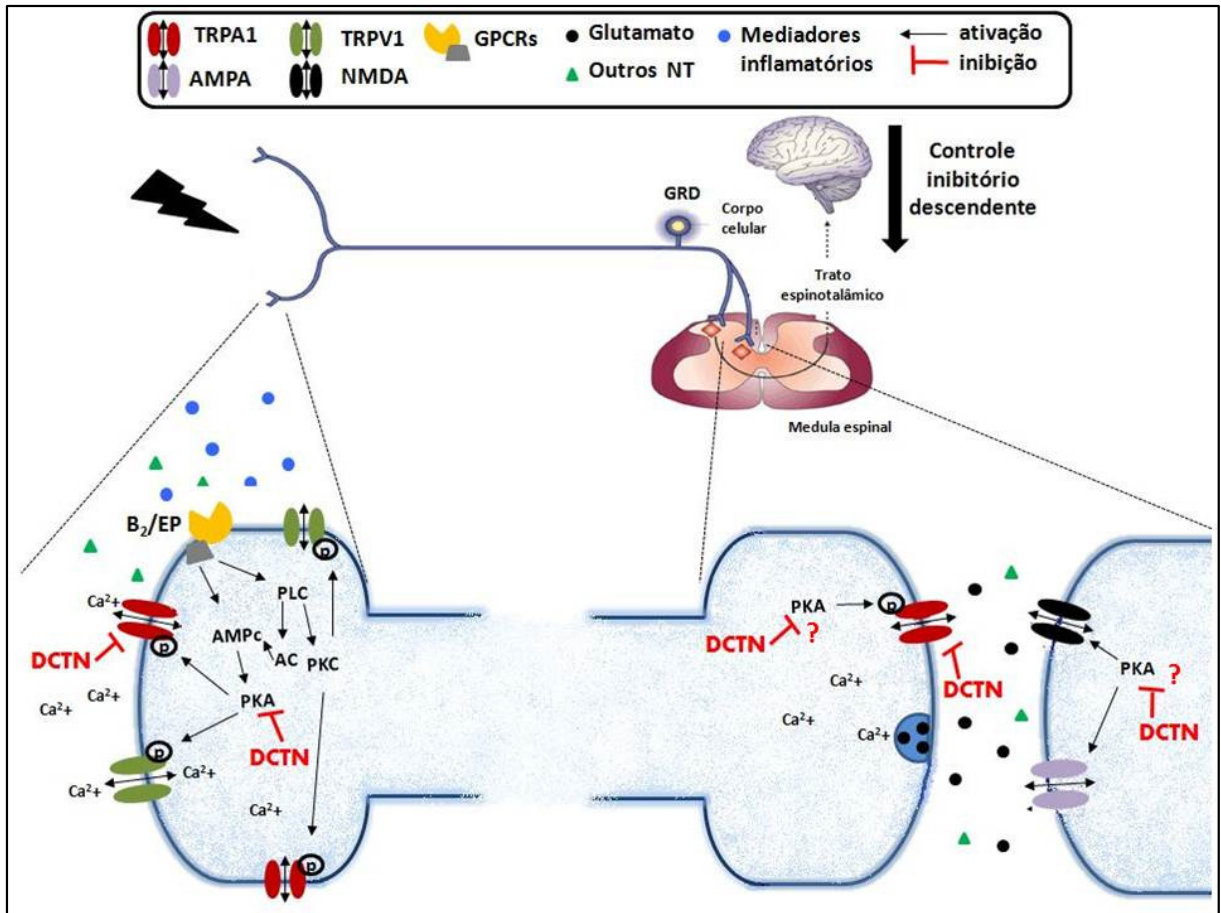


Figura 31 – Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da dicentrina

Representação esquemática de uma fibra aferente primária e sua sinapse no corno dorsal da medula espinal. No terminal periférico, mediadores inflamatórios como a bradicinina e prostaglandina E<sub>2</sub>, ativando receptores B<sub>2</sub> e EP, respectivamente, ativam as vias PLC/PKC e AC/AMPc/PKA. A PKC e a PKA, entre outras ações, fosforilam canais TRPA1 e TRPV1, diminuindo seu limiar de ativação. A dicentrina, por sua vez, pode exercer sua ação periférica por bloqueio direto de canais TRPA1, ou por inibição da fosforilação (e conseqüente ativação) da PKA. No corno dorsal da medula espinal, a dicentrina também pode bloquear os canais TRPA1 presentes na terminação central da fibra aferente primária, além de inibir a fosforilação da PKA. Estas ações, por sua vez, podem diminuir a liberação sináptica de glutamato e diminuir a transmissão mediada pelos receptores AMPA e NMDA, cuja ativação é parcialmente dependente de fosforilação mediada pela PKA. Desta forma, as ações centrais da dicentrina reduzem a sensibilização central, diminuindo a hipersensibilidade associada aos estados crônicos de dor.

## 6. CONCLUSÕES

Resumidamente, as seguintes observações baseiam as conclusões deste trabalho:

- ❖ A fração clorofórmica obtida do extrato de frutos de *Ocotea puberula* apresenta efeito antinociceptivo nos modelos agudos da formalina e ácido acético;
- ❖ A fração clorofórmica obtida do extrato de frutos de *Ocotea puberula* apresenta uma composição rica em alcaloides, sendo a dicentrina o componente majoritário;
- ❖ A dicentrina também apresenta efeito antinociceptivo nos modelos agudos da formalina e ácido acético, com  $DI_{50}$  bastante semelhantes às encontradas para a fração clorofórmica;
- ❖ A dicentrina apresenta efeito antinociceptivo, diminuindo a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio em modelos crônicos, tanto inflamatórios quanto neuropáticos;
- ❖ A dicentrina é capaz de reduzir a nocicepção e a hipersensibilidade térmica induzida por ativadores de canais TRPA1, sem interferir nos efeitos induzidos por ativadores de canais TRPV1;
- ❖ A dicentrina é capaz de prevenir a fosforilação da PKA, diminuindo a nocicepção e a hipersensibilidade induzida por mediadores inflamatórios e ativadores do AMPc;
- ❖ Os efeitos antinociceptivos da dicentrina não são mediados por interação com os principais sistemas endógenos de controle descendente da dor – opióide, adrenérgico, serotoninérgico e canabinóide;
- ❖ O efeito antinociceptivo da dicentrina não é decorrente de efeitos inespecíficos sobre a atividade locomotora ou sedação;
- ❖ A administração diária da dicentrina, durante 14 dias, não acarreta alterações perceptíveis em indicadores toxicológicos como percentual de ganho de peso ou peso relativo de órgãos vitais como o coração, pulmões, rins e baço;



- ❖ Embora a dicentrina tenha causado um aumento no peso relativo do fígado após 14 dias de administração, não foram encontradas alterações significativas nos níveis de enzimas hepáticas.

Estas observações permitem concluir que o extrato dos frutos de *Ocotea puberula* possui um importante efeito antinociceptivo em modelos agudos, o qual é resultante, ao menos em parte, da presença do alcaloide dicentrina. A dicentrina, por sua vez, apresenta um efeito antinociceptivo significativo tanto em modelos agudos quanto em modelos crônicos de dor de origem inflamatória e neuropática, sendo este efeito mediado por interação com canais TRPA1 e com a via de sinalização mediada por AMPc/PKA.

Estes dados suportam o uso popular da *Ocotea puberula*, e a aparente baixa toxicidade da dicentrina a evidencia como potencial candidata para continuidade de estudos pré-clínicos aprofundados, e futuramente ensaios clínicos, visando o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

## REFERÊNCIAS

AHERN, G.P.; BROOKS, I.M.; MIYARES, R.L.; WANG, X.B. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **The Journal of Neuroscience** 25: 5109-16, 2005

AKOPIAN, A.N. Regulation of the nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. **Current Pharmaceutical Biotechnology** 12: 89-94, 2011

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **The Journal of Neuroscience** 19: 2181-2186, 1999

ALEY, K.O.; MARTIN, A.; McMAHON, T.; MOK, J.; LEVINE, J.D.; MESSING, R.O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **The Journal of Neuroscience** 21: 6933-6939, 2001

ALI, Z.; RINGKAMP, M.; HARTKE, T.V.; CHIEN, H.F.; FLAVAHAN, N.A.; CAMPBELL, J.N.; MEYER, R.A. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. **Journal of Neurophysiology** 81: 455-466, 1999

ANDERSSON, D.A.; GENTRY, C.; MOSS, S.; BEVAN, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **The Journal of Neuroscience** 28: 2485-94, 2008

ANDRADE E.L.; FERREIRA, J.; ANDRE, E.; CALIXTO, J.B. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. **Biochemical Pharmacology** 72: 104-14, 2006

ANDRADE, E.L.; LUIZ, A.P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J.B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience** 152: 511-520, 2008

ANDRADE, E.L.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics** 133: 189-204, 2012

ARAUJO, A.J. **Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (Lauraceae)** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPAA, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T.S.; NURMIKKO, T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European Journal of Neurology** 17: 1113-1123, 2010

BAIK, E.; CHUNG, J.M.; CHUNG, K. Peripheral norepinephrine exacerbates neuritis-induced hyperalgesia. **The Journal of Pain** 4: 212-221, 2003

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: in vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia** 81: 289-295, 2010

BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; VISWANATH, V.; EID, S.R.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradikinin. **Neuron** 41: 849-857, 2004

BANIK, R.K.; SATO, J.; YAJIMA, H.; MIZUMURA, K. Differences between the Lewis and Sprague–Dawley rats in chronic inflammation induced norepinephrine sensitivity of cutaneous C-fiber nociceptors. **Neuroscience Letters** 299: 21-24, 2001

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; COMIM, J. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia** 28: 875-876, 1972

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; MOLTRASIO, G.Y.; GIACOPELLO, D. Thalictminine from *Ocotea puberula*. **Phytochemistry** 12: 948-949, 1973

BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P.R.R. Pure enantiomeric substances: the question of chiral drugs. **Química Nova** 20: 647-656, 1997

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

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell** 139: 267-284, 2009

BAUTISTA, D.M.; MOVAHED, P.; HINMAN, A.; AXELSSON, H.E.; STERNER, O.; HOGESTATT, E.D.; JULIUS, D.; JORDT, S.E.; ZYGMUNT, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 102: 12248-12252, 2005

BAUTISTA, D.M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.R.; READ, A.J.; POBLETE, J.; YAMOA, E.N.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell** 124: 1269-1282, 2006

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; HESS, S.C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R.A. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Medica** 65: 50-55, 1999

BERMUDEZ, J.A.Z.; BARRAGAT, P. Chiral drugs: from the chemical dimension to political discussion. **Cadernos de Saúde Pública** 12: 47-51, 1996

BHAVE, G.; HU, H.J.; GLAUNER, K.S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D.J.; OXFORD, G.S.; GEREAU, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 100: 12480-12485, 2003

BLACKSHAW, L.A.; BRIERLEY, S.M.; HUGHES, P.A. TRP channels: new targets for visceral pain. **Gut** 59: 126-135, 2010

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

CALIXTO, J.B.; KASSUYA, C.A.L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their function. **Pharmacology & Therapeutics** 106: 179-208, 2005

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Term-stability of extractive processes from *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae for Soxhlet modified system. **Química Nova** 32: 1031-1035, 2009

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica. v.1. Colombo – PR: Embrapa Florestas, 2003

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

CAVA, M.P.; WATANABE, Y.; BESSHO, K.; MITCHELL, M.J.; DaROCHA, A.L.; HWANG, B.; DOUGLAS, B.; WEISBACH, J.A. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. **Tetrahedron Letters** 20: 2437 - 2442, 1968

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

CHEN, K.S.; KO, F.N.; TENG, C.M.; WU, Y.C.. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some benzylisoquinoline and phenantrene alkaloids. **Journal of Natural Products** 59: 531-534, 1996

CHEN, K.S.; WU, Y.C.; TENG, C.M.; KO, F.N.; WU, T.S. Bioactive alkaloids from *Illigera luzonensis*. **Journal of Natural Products** 60: 645-647, 1997

CHEN, Y.; YANG, C.; WANG, Z.J. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. **Neuroscience** 193: 440-451, 2011

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

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy** 32: 295-310, 1968

CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta** 1772: 978-988, 2007

COY, E.D.; CUCA, L.E.; SEFKOW, M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 19: 6922-6925, 2009

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

DA COSTA, D.S.M.; MEOTTI, F.C.; ANDRADE, E.L.; LEAL, P.C.; MOTTA, E.M.; CALIXTO, J.B. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain** 148: 431-437, 2010

DAWSON, L.F.; PHILLIPS, J.K.; FINCH, P.M.; INGLIS, J.J.; DRUMMOND, P.D. Expression of  $\alpha$ 1-adrenoceptors on peripheral nociceptive neurons. **Neuroscience** 175: 300-314, 2011

DE OLIVEIRA, D.C.; CHRISTIANO, J.C.S.; SOARES, G.L.G.; ISAIAS, R.M.S. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasileira de Botânica** 29: 657-667, 2006.

DEL CAMINO, D.; MURPHY, S.; HEIRY, M.; BARRETT, L.B.; EARLEY, T.J.; COOK, C.A.; PETRUS, M.J.; ZHAO, M.; D'AMOURS, M.; DEERING, N.; BRENNER, G.J.; COSTIGAN, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; FANGER, C.M.; WOOLF, C.J.; PATAPOUTIAN, A.; MORAN, M.M. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. **Journal of Neuroscience** 30: 15165-15174, 2010

DOBKIN, P.L.; BOOTHROYD, L.J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. **Pain Medicine** 9: 881-889, 2008

DOLAN, S.; NOLAN, A.M. Biphasic modulation of nociceptive processing by the cyclic AMP-protein kinase A signaling pathway in sheep spinal cord. **Neuroscience Letters** 309: 157-160, 2001

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia** 75: 125-131, 1995

DUARTE, P.C.; ST-JACQUES, B.; MA, W. Prostaglandin E2 contributes to the synthesis of brain-derived neurotrophic factor in primary sensory neuron in ganglion explant cultures and in a neuropathic pain model. **Experimental Neurology** 234: 466-481, 2012

DUBINSKY, B.; GEBRE-MARIAM, S.; CAPETOLA, R.J.; ROSENTHALE, M.E. The antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents and Actions** 20: 50-60, 1987

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

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 107: 385-393, 1953

EID, S.R.; CROWN, E.D.; MOORE, E.L.; LIANG, H.A.; CHOONG, K.C.; DIMA, S.; HENZE, D.A.; KANE, S.A.; URBAN, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Molecular Pain** 4:48, 2008

FARAGO, P.V. **Estudo morfo-anatômico e fitoquímico de Ocotea puberula (Rich.) Nees, família Lauraceae, da região dos campos gerais, Ponta Grossa, Paraná** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2002

FERNANDES, E.S.; FERNANDES, M.A.; KEEBLE, J.E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory neurons. **British Journal of Pharmacology** 166: 510-521, 2012

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. **Neuropharmacology** 41: 1006-1012, 2001

FERREIRA, J.; SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology** 141: 787-794, 2004

FERREIRA, J.; TRICHÊS, K.M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase A activation in mice. **Pain** 117: 171-181, 2005

FLATTERS, S.J.L.; BENNETT, G.J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain** 109: 150-161, 2004

FU, K.Y.; LIGHT, A.R.; MATSUSHIMA, G.K.; MAIXNER, W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. **Brain Research** 825: 59-67, 1999

GAO, X.; KIM, H.K.; CHUNG, J.M.; CHUNG, K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. **Pain** 116: 62-72, 2005

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; DA SILVA, L.M.G.E.; HAMERSKI, L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the west-central region of Brazil. **Bioresource Technology** 100: 6647-6650, 2009

HAJHASHEMI, V.; RABBANI, M.; GHANADI, A.; DAVARI, E. Evaluation of antianxiety and sedative effects of essential oil of *Ducrosia anethifolia* in mice. **Clinics** 65: 1037-1042, 2010

HIRANO, E.; POSSAMAI, E. Estádio de maturação do fruto e germinação de sementes de três espécies de Lauraceae. **Scientia Agraria** 9: 219-223, 2008

HOET, S.; STEVIGNY, S.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity and interaction with DNA topoisomerases. **Planta Medica** 70: 407-413, 2004

HUANG, R.L.; CHEN, C.C.; HUANG, Y.L. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica** 64: 212-215, 1998

HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P.A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 17: 638-645, 2006

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods** 14: 69-76, 1985

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** 30: 103-114, 1987

IACOBUCCI, G.A. Ocoteine, the alkaloid separated from the bark of *Ocotea puberula*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina** 42: 18-29, 1954

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

JIANG, L.H.; GAMPER, N.; BEECH, D.J. Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. **Current Drug Targets** 12: 724-736, 2011

JORDT, S.E.; BAUTISTA, D.M.; CHUANG, H.H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature** 427: 260-265, 2004

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

KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, J.; CLAUDINO, R.F.; CALIXTO, J.B. Intraplantar PGE<sub>2</sub> causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British Journal of Pharmacology** 150: 727-737, 2007

KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAY, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Experimental Neurology** 200: 112-123, 2006

KERSTEIN, P.C.; DEL CAMINO, D.; MORAN, M.M.; STUCKY, C.L. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. **Molecular Pain** 5: 19, 2009

KHASAR, S.G.; GREEN, P.G.; CHOU, B.; LEVINE, J.D. Peripheral nociceptive effects of alpha-2-adrenergic receptor agonists in the rat. **Neuroscience** 66: 427-432, 1995

KHASAR, S.G.; LIN, Y.H.; MARTIN, A.; DADGAR, J.; McMAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; McCARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, J.D., MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C $\epsilon$  mutant mice. **Neuron** 24: 253-260, 1999

KIM, D.; YOU, B.; JO, E.K.; HAN, S.K.; SIMON, M.I.; LEE, S.J. NAPDH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 107: 14851-14856, 2010

KINNMAN, E.; LEVINE, J.D. Involvement of the sympathetic postganglionic neuron in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in the rat. **Neuroscience** 65: 283-291, 1995

KLAFKE, J.Z.; DA SILVA, M.A.; TREVISAN, G.; ROSSATO, M.F.; DA SILVA, C.R.; GUERRA, G.P.; VILLARINHO, J.G.; RIGO, F.K.; DALMOLIN, G.D.; GOMEZ, M.V.; RUBIN, M.A.; FERREIRA, J. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. **Neuroscience** 222: 136-146, 2012

KONKIMALLA, V.B.; EFFERTH, T. Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aporphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. **Biochemical Pharmacology** 79: 1092-1099, 2010

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DeBEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings** 18: 418-420, 1959

KOSUGI, M.; NAGATSUKA, T.; FUJITA, T.; KURODA, Y.; KUMAMOTO, E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **The Journal of Neuroscience** 27: 4443-4451, 2007

KWAN, K.Y.; ALLCHORNE, A.J.; VOLLRATH, M.A.; CHRISTENSEN, A.P.; ZHANG, D.S.; WOOLF, C.J.; COREY, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron** 50: 277-289, 2006



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

LEE, D.H.; LIU, X.; KIM, H.T.; CHUNG, K.; CHUNG, J.M. Receptor subtype mediating the adrenergic sensitivity of pain behavior and ectopic discharges in neuropathic Lewis rats. **Journal of Neurophysiology** 81: 2226-2233, 1999

LEVY, D.; STRASSMAN, A.M. Distinct sensitizing effects of the cAMP–PKA second messenger cascade on rat dural mechanonociceptors. **Journal of Physiology** 538: 483-493, 2002

LI, K.; LIN, T.; CAO, Y.; LIGHT, A.R.; FU, K.Y. Peripheral formalin injury induces 2 stages of microglial activation in the spinal cord. **The Journal of Pain** 11: 1056-1065, 2010

LIEBMANN, C.; BÖHMER, F.D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. **Current Medicinal Chemistry** 7: 911-943, 2000

LIMA, V.L.E. Drugs and chirality: a brief overview. **Química Nova** 20: 657-663, 1997

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

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

LONGHI-BALBINOT, D.T.; MARTINS, D.F.; LANZMASTER, D.; SILVA, M.D.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R.S. Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **European Journal of Pharmacology** 653: 32-40, 2011

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, 2002

LUIZ, A.P.; MOURA, J.D.; MEOTTI, F.C.; GUGINSKI, G.; GUIMARÃES, C.L.S.; AZEVEDO, M.S.; RODRIGUES, A.L.S.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology** 114: 355-363, 2007

LUSZCZKI, J.J.; CZUCZWAR, S.J. Isobolographic characterization of interactions between vigabatrin and tiagabine in two experimental models of epilepsy. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry** 31: 529-538, 2007

MA, W.; CHABOT, J.G.; VERCAUTEREN, F.; QUIRION, R. Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. **Neurobiology of Aging** 31: 1227-1237, 2010

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

MALMBERG, A.B.; BRANDON, E.P.; IDZERDA, R.L.; LIU, H.; McKNIGHT, G.S.; BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of Neuroscience** 17: 7462-7470, 1997

MANNION, R.J.; DOUBELL, T.P.; COGGESHALL, R.E.; WOOLF, C.J. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. **The Journal of Neuroscience** 16: 5189-5195, 1996

MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J.; HAYES, R.L. Pain-related increases in spinal cord membrane-bound protein kinase C following peripheral nerve injury. **Brain Research** 588: 144-149, 1992

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; McMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience** 6: 521-532, 2005

MARQUESINI, N.R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil – Guarani, Kaingang, Xogleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1995

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

McMAHON, S.B.; BENNETT, D.L.H.; BEVAN, S. Inflammatory mediators and modulators of pain. *In*: McMahon, S.B.; Koltzenburg, M. (eds). **Wall and Melzack's textbook of pain**. Elsevier: Philadelphia, p. 49-72, 2008

McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 104: 13525-13530, 2007

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 316: 789-796, 2006

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

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

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience** 10: 23-36, 2009

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science's STKE** 272: re3, 2005

MONTRUCCHIO, D.P.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W.; SILVA, G.A.; CARDOZO, A.M.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica** 78: 1543-1548, 2012

MORAN, M.M.; MCALEXANDER, M.A.; BIRÓ, T.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery** 10: 601-620, 2011

MORTEZA-SEMNANI, K.; AMIN, G.; SHIDFAR, M.R.; HADIZADEH, H.; SHAFIEE, A. Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. **Fitoterapia** 74: 493-496, 2003

NASCIMENTO, F.P.; FIGUEREDO, S.M.; MARCON, R.; MARTINS, D.F.; MACEDO-JUNIOR, S.J.; LIMA, D.A.N.; ALMEIDA, R.C.; OSTROSKI, R.M.; RODRIGUES, A.L.S.; SANTOS, A.R.S. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor subtypes and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 334: 590-598, 2010

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. *In*: Wermuth, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 3 ed., Elsevier. p. 159-186, 2008

OBATA, K.; KATSURA, H.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **The Journal of Clinical Investigation** 115: 2393-2401, 2005

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 313: 310-318, 2005

PALMER, J. A.; HIGUERA, E. S.; CHANG, L.; CHAPLAN S. R. Fatty acid amide hydrolase inhibition enhances the anti-allodynic actions of endocannabinoids in a model of acute pain adapted for the mouse. **Neuroscience** 154: 1554-1561, 2008

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience** 8: 71-80, 2007

PERL, E.R. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. **Progress in Neurobiology** 94: 20-38, 2011

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology** 80: 53-83, 2006

PERTOVAARA, A.; KOIVISTO, A. TRPA1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. **European Journal of Pharmacology** 666: 1-4, 2011

PETRUS, M.; PEIER, A.M.; BANDELL, M.; HWANG, S.W.; HUNH, T.; OLNEY, N.; JEGLA, T.; PATAPOUTIAN, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Molecular Pain** 3:40, 2007

PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; NOGUEIRA, C.W.; SAVEGNAGO, L. Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 88: 487-496, 2008

PREMKUMAR, L.S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. **Life Sciences** 2012, *in press*

PREMKUMAR, L.S.; AHERN, G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature** 408: 985-990, 2000

PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase 2 activity. **Pain** 64: 345-355, 1996

REEH, P.W.; KRESS, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Current Opinion in Pharmacology** 1: 45-51, 2001

REN, Y.; ZOU, X.; FANG, L.; LIN, Q. Sympathetic modulation of activity in A $\delta$ - and C-primary nociceptive afferents after intradermal injection of capsaicin in rats. **Journal of Neurophysiology** 93: 365-377, 2005

RIBEIRO, R.A.; LEITE, J.R. Nantenine alkaloid presents anticonvulsant effect on two classical animal models. **Phytomedicine** 10: 563-568, 2003

RODRIGUES, A.L.S.; SILVA, G.L.; METEUSSI, A.S. FERNANDES, E.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Involvement of monoaminergic system in the antirepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences** 70: 1347-1358, 2002

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

SACHS, D.; VILLARREAL, C.F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. The role of PKA and PKC $\epsilon$  pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **British Journal of Pharmacology** 156: 826-834, 2009

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobediol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 289: 4417-426, 1999

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2000, p. 324-325

SANTOS, A.R.S.; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L.; TIBOLA, D.; PASZCUK, A.F.; NETO, A.; SPINDOLA, H.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.L.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology** 48: 1021-1034, 2005

SCHAFERS, M.; MARZINIAK, M.; SORKIN, L.S.; YAKSH, T.L.; SOMMER, C. Cyclooxygenase inhibition in nerve injury- and TNF- induced hyperalgesia in the rat. **Experimental Neurology** 185: 160-168, 2004

SCHIENE, K.; VRY, J.D.; TZSCHENTKE, T.M. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 339: 537-544, 2011

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalina test: characteristic biphasic pain response. **Pain** 38: 347-352, 1989

SILVA, P. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 431-432, 2002

SIMÃO DA SILVA, K.A.B.; PASZCUK, A.F.; PASSOS, G.F.; SILVA, E.S.; BENTO, A.F.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, J.B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain** 152: 1872-1887, 2011

SKALHEGG, B.S.; TASKÉN, K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway: differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience** 2: 331-342, 1997

SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatomia do desenvolvimento do fruto de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees e de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Acta Científica Venezolana** 51: 84-89, 2000

STEMKOWSKI, P.L.; SMITH, P.A. Sensory neurons, ion channels, inflammation and the onset of neuropathic pain. **The Canadian Journal of Neurological Sciences** 39: 416-435, 2012

STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; DE PAUW-GILLET, M.C.; DE HOFFMANN, E.; LLABRES, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. **Planta Medica** 68: 1042-1044, 2002

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents** 5: 173-182, 2005

STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; EID, S.R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T.R.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; ANDERSSON, D.A.; HWANG, S.W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell** 112: 819-829, 2003

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** 60: 2-23, 2009

SVENSSON, C.I.; MARSALA, M.; WESTERLUND, A.; CALCUTT, N.A.; CAMPANA, W.M.; FRESHWATER, J.D.; CATALANO, R.; FENG, Y.; PROTTER, A.A.; SCOTT, B.; YAKSH, T.L. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. **Journal of Neurochemistry** 86: 1534-1544, 2003

SWEITZER, S.M.; WONG, S.M.E.; PETERS, M.C.; MOCHLY-ROSEN, D.; YEOMANS, D.C.; KENDIG, J.J. Protein kinase C  $\epsilon$  and  $\gamma$ : involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 309: 616-625, 2004

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience** 44: 131-135, 1991

TAYLOR, S.S.; KIM, C.; CHENG, C.Y.; BROWN, S.H.J.; WU, J.; KANNAN, N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. **Biochimica et Biophysica Acta** 1784: 16-26, 2008

TENG, C.M.; YU, S.M.; KO, F.N.; CHEN, C.C.; HUANG, Y.L.; HUANG, T.F. Dicentrine, a natural vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. **British Journal of Pharmacology** 104: 651-656, 1991

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

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron** 21: 531-543, 1998

TRACEY, D.J.; CUNNINGHAM, J.E.; ROMM, M.A. Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: mediation by alpha-2-adrenoceptors on postganglionic sympathetic terminals. **Pain** 60: 317-327, 1995

VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 278: 304-312, 1996

VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacological Research** 55: 578-589, 2007

VELLANI, V.; MAPPLEBECK, S.; MORIONDO, A.; DAVIS, J.B.; McNAUGHTON, P.A. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. **Journal of Physiology** 534: 813-825, 2001

VILLARREAL, C.F.; FUNEZ, M.I.; FIGUEIREDO, F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. Acute and persistent nociceptive paw sensitization in mice: the involvement of distinct signaling pathways. **Life Sciences** 85: 822-829, 2009

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain** 131: 1241-1251, 2008

WEI, H.; CHAPMAN, H.; SAARNILEHTO, M.; KUOKKANEN, K.; KOIVISTO, A.; PERTOVAARA, A. Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. **Neuropharmacology** 58: 578-584, 2010

WEI, H.; KOIVISTO, A.; SAARNILEHTO, M.; CHAPMAN, H.; KUOKKANEN, K.; HAO, B.; HUANG, J.L.; WANG, Y.X.; PERTOVAARA, A. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. **Pain** 152: 582–591, 2011

WHO. World Health Organization. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2000. 80 p.

WHO. World Health Organization. **WHO traditional medicine strategy 2002–2005**. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002. 74 p.

WHO. World Health Organization. **Traditional medicine**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Acesso em 01/08/2011

WOO, S.H.; SUN, N.J.; CASSADY, J.M.; SNAPKA, R.M. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. **Biochemical Pharmacology** 57: 1141-1145, 1999

WOOLF, C.J.; DOUBELL, T.P. The pathophysiology of chronic pain – increased sensitivity to low threshold A $\beta$ -fibre inputs. **Current Opinion in Neurobiology** 4: 525-534, 1994

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet** 353: 1959-1964, 1999

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science** 288: 1765-1768, 2000

WOOLF, C.J.; THOMPSON, S.W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. **Pain** 44: 293-299, 1991

YAJIMA, Y.; NARITA, M.; SHIMAMURA, M.; NARITA, M.; KUBOTA, C.; SUZUKI, T. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. **Brain Research** 992: 288–293, 2003

YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T.J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in  $^3\text{H}$ -phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **The Journal of Neuroscience** 15: 3263-3272, 1995

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

YU, S.M.; HSU, S.Y.; KO, F.N.; CHEN, C.C.; HUANG, Y.L.; HUANG, T.F.; TENG, C.M. Haemodynamic effects of dicentrine, a novel  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist: comparison with prazosin in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. **British Journal of Pharmacology** 106: 797-801, 1992

YU, S.M.; KANG, Y.F.; CHEN, C.C.; TENG, C.M. Effects of dicentrine on haemodynamic, plasma lipid, lipoprotein level and vascular reactivity in hyperlipidaemic rats. **British Journal of Pharmacology** 108: 1055-1061, 1993

ZANIN, S.M.W.; LORDELLO, A.L.L. Aporphine alkaloids in *Ocotea* species (Lauraceae). **Quimica Nova** 30: 92-98, 2007

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, O.G.; MONTRUCCHIO, D.P.; COSTA, C.K.; LAGOS, J.B. Mudanças de *Ocotea puberula* (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcalóides aporfinoídeos. **Quimica Nova** 34: 743-747, 2011

ZHOU, B.N.; JOHNSON, R.K.; MATTERN, M.R.; WANG, X.; HECHT, S.M.; BECK, H.T.; ORTIZ, A.; KINGSTON, D.G.I. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. **Journal of Natural Products** 63: 217-221, 2000

ZHUO, M. Glutamate receptors and persistent pain: targeting forebrain NR2B subunits. **Drug Discovery Today** 7: 259-267, 2002

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

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S.E.; PAULUS, K.; BAUER, R.; STADEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology** 71: 219-230, 2000



## **ANEXO 1**

### **Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated From Fruits of *Ocotea puberula***

Planta Medica 78: 1543-1548, 2012

# Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*

## Authors

Deise Prehs Montrucchio<sup>1,2</sup>, Obdulio Gomes Miguel<sup>1</sup>, Sandra Maria Warumby Zanin<sup>1</sup>, Gabriel Araujo da Silva<sup>3</sup>, Alcibia Maia Cardozo<sup>4</sup>, Adair Roberto Soares Santos<sup>2,5</sup>

## Affiliations

The affiliations are listed at the end of the article

## Key words

- *Ocotea puberula*
- Lauraceae
- alkaloid
- dicentrine
- antinociception

## Abstract

▼ The present work describes the chemical characterization of a chloroform fraction (CF) obtained from an extract of *Ocotea puberula* (Lauraceae) fruits, and preliminary antinociceptive analysis of CF and the alkaloid dicentrine, isolated from this fraction. CF (30–300 mg/kg, p.o.) caused dose-related inhibition of abdominal constrictions caused by acetic acid and also inhibited both phases of formalin-induced nociception. However, hexane or ethyl acetate fractions did not produce any effect. Antinociception caused by CF (100 mg/kg, p.o.) in the acetic acid test was not affected either by caffeine, an adenosine receptor antagonist, or by naloxone, an opioid receptor antagonist, and neither was associated with nonspe-

cific effects such as muscle relaxation or sedation. Furthermore, dicentrine (30–300 mg/kg, p.o.) produced dose-related inhibition of acetic acid-induced pain without causing changes in the motor performance of mice. The results show, for the first time, that CF from *Ocotea puberula* fruits produced marked antinociception in different models of chemical pain, and this effect appears to be, at least in part, due to the presence of dicentrine. The mechanism by which CF and the alkaloid produced antinociception still remains unclear, but the adenosinergic or opioid system seems unlikely to be involved in this action.

**Supporting information** available online at <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

## Introduction

▼ *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae is a Brazilian native tree whose phytochemical composition includes several classes of chemicals, such as alkaloids, tannins, steroids, and triterpenes [1,2]. Among the alkaloids, the aporphinic types are the most abundant in this species, including ocoteine, dehydroocotein, didehydroocotein, dicentrine, predicentrine, isodomesticine, and leucosine [1, 3–7]. Several biological properties have been described for many aporphinic alkaloids, including dicentrine. This alkaloid was already reported as having a cytostatic effect against some tumor cell lines from mice and humans [8–11], inhibition effects on platelet aggregation induced by arachidonic acid [12, 13], and vasorelaxing and antihypertensive actions by antagonism of  $\alpha_1$ -adrenoceptors [14–16]. In an ethnobotanical study with the indigenous populations from Parana and Santa Catarina states, Brazil, it was reported that *O. puberula* is used for the treatment of tumors and cutaneous affections [17]. Moreover, it has been

reported that several species of plants belonging to the genus *Ocotea* are endowed with antinociceptive and anti-inflammatory activity [18,19]. Taking into account the biological activities of the *Ocotea* genus and the popular uses of *O. puberula*, it is surprising that no pharmacological study has been carried out on the possible antinociceptive effects of *O. puberula* up to now. Furthermore, in the state of Parana, south Brazil, some trees of *O. puberula* were found to produce larger fruits than those described in the literature by Souza and Moscheta [20], and here we attempted to examine: (i) the possible antinociceptive action of the chloroform (CF), hexane (HF), or ethyl acetate (EAF) fractions obtained from these larger *O. puberula* fruits in chemical models of nociception in mice; (ii) the isolation, chemical identification, and preliminary pharmacological evaluation of the alkaloid dicentrine isolated from this plant; and (iii) the possible involvement of adenosinergic and opioidergic systems in the antinociceptive action of the CF fraction.

received May 7, 2012  
revised June 5, 2012  
accepted June 8, 2012

## Bibliography

**DOI** <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1315026>  
Published online  
Planta Med © Georg Thieme  
Verlag KG Stuttgart · New York ·  
ISSN 0032-0943

## Correspondence

**Prof. Dr. Adair R. S. Santos**  
Departamento de Ciências  
Fisiológicas  
Universidade Federal de  
Santa Catarina  
R. Roberto Sampaio  
Gonzaga, s/n  
Florianópolis, 88040-900, SC  
Brazil  
Phone: + 55 48 37 21 93 52 (206)  
Fax: + 55 48 37 21 96 72  
arssantos@ccb.ufsc.br

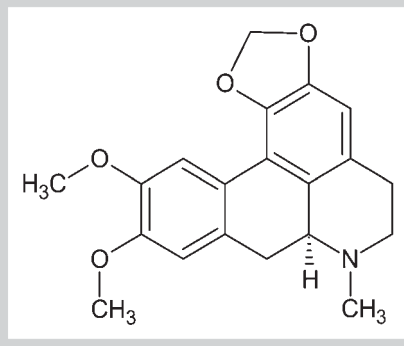
## Materials and Methods



### Plant material, chemical extraction and identification

*Ocotea puberula* fruits were collected in Curitiba, state of Parana, Brazil in February 2008, from trees exhibiting larger fruits, and voucher specimens were identified by Dr. Marcelo Brotto and deposited in the Botanical Museum of Curitiba, under the numbers 342996, 342997, and 342998. Fresh fruits (1.0 kg, equivalent to 0.6 kg in dried basis) were triturated with ethanol, placed in a Soxhlet apparatus, and extracted with a mixture of ethanol and acetone (1 : 1) under reflux for 24 hours.

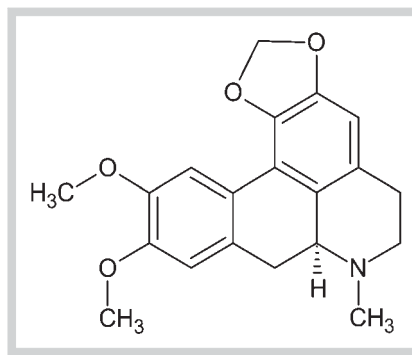
The crude extract (approximately 1000 mL) was concentrated under reduced pressure to approximately 300 mL, filtered, and fractionated in a modified Soxhlet apparatus [21] for 6–8 hours with solvents of increasing polarity. The modification of Soxhlet equipment consists of a lateral extension of the siphon from the upper curve, preventing the reflux of the solvent, and allowing the extraction from the liquid material. From this process, four fractions were obtained and then concentrated under reduced pressure until total removal of the solvent, yielding dried residues of the *n*-hexanic fraction (HF, 1.54 g), chloroform fraction (CF, 10.69 g), ethyl acetate fraction (EAF, 1.90 g), and residual alcoholic fraction (RES, 1.93 g). The CF fraction was tested by simple reaction with Dragendorff reagent (bismuth subnitrate, nitric acid, and potassium iodide) and revealed to contain alkaloids.

CF was adsorbed in silica gel 60 (70–230 mesh; Merck™) and submitted to a column chromatography (30 × 6 cm, with a base of G3 sintered glass), eluted with solvents of increasing polarity in portions of 100 mL, ranging from *n*-hexane/chloroform (70:30), increasing polarity at 5% until pure chloroform, and then adding methanol at 5% increases until chloroform/methanol (70:30). Fractions were collected in 10 mL portions and monitored by TLC using a mobile phase of toluene/ethyl acetate/diethylamine (8:90:2) and were revealed with Dragendorff reagent. Fractions with the same TLC profile were united and the solvent was left to spontaneously evaporate, allowing crystallization. The white crystals were filtered in a sintered glass filter and washed with cold methanol, yielding a pure substance, which was submitted to <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis in CDCl<sub>3</sub> (NMR Bruker DPX 200, 200 and 50 MHz, respectively) and identified as being the aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine (DCTN,  Fig. 1), based on comparison with literature data [6]. The melting point was determined as being 168–169 °C (PF 1000 Gehaka) and the optical rotation was measured on a Polartronic E (Schmidt + Haensch GmbH & Co.), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +62.0° (*c* = 1.0, chloroform).

HPLC of DCTN and CF was performed on a Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific) equipped with a C18–5 μm ACE column (250 × 4.6 mm) and a mobile phase composed of 15% acetonitrile in acidified water (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%), with a flow rate of 1 mL/min.

### Animals

Experiments were conducted using adult male Swiss mice (25–35 g) obtained from the animal facility of Universidade Federal de Santa Catarina. Animals were housed at 22 ± 2 °C under a 12-h dark/12-h light cycle with free access to food and water, and acclimatized to the laboratory for at least one hour prior to testing. All experiments were previously approved by the Ethics Committee for Animal Research of Universidade Federal de Santa Catarina (Protocol number PP00462, approved on December 9, 2010) and were conducted in accordance to the current guidelines for



**Fig. 1** Chemical structure of dicentrine.

the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals [22]. The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatment.

### Formalin-induced nociception

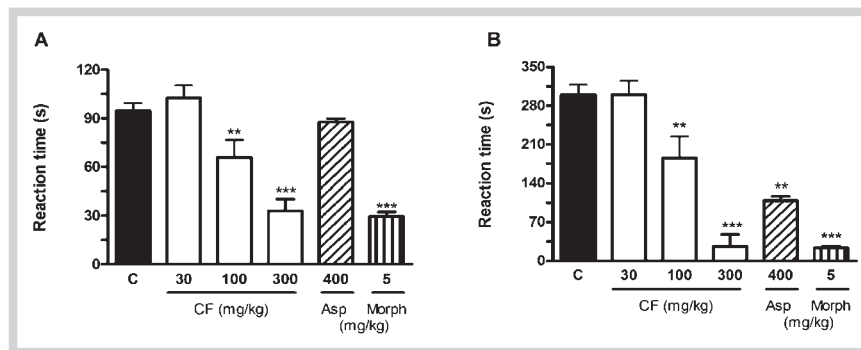
The formalin test was carried out as described previously [23]. Animals received an intraplantar injection of 20 μL of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde), in the ventral surface of the right hind paw, and were observed during the first 5 minutes (neurogenic phase) and during the 15th to 30th minute (inflammatory phase). Mice were pretreated with HF, CF, or EAF (30–300 mg/kg, p.o.), aspirin (400 mg/kg, p.o., used as a positive control) or morphine (5 mg/kg, s.c., used as a positive control) 1 or 0.5 h before formalin injection [24], and control animals received the same volume of vehicle. After the formalin injection, animals were immediately placed into glass cylinders of 20 cm diameter, and the time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer, as indicative of nociception.

### Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of acetic acid

Nociception induced by acetic acid was evaluated as described previously [23], where animals received a single intraperitoneal injection of a 0.6% acetic acid solution (450 μL) and the nociceptive response, observed as contractions of the abdominal muscle together with a hind limb stretching, were cumulatively counted during a period of 20 minutes. Mice were pretreated with CF (30–300 mg/kg, p.o.) or aspirin (400 mg/kg, p.o., used as a positive control) or with DCTN (30–300 mg/kg, p.o.) 1 h before acetic acid injection, and control animals received the same volume of vehicle. After the irritant injection, mice were placed into 20-cm diameter glass cylinders and the abdominal constrictions were cumulatively counted during a 20-minute period.

### Evaluation of a possible involvement of opioidergic system

To evaluate the possible involvement of the opioid system, mice were pretreated with the nonselective opioid receptor antagonist naloxone (1 mg/kg, i.p.) 20 minutes before morphine (2.5 mg/kg, s.c., used as a positive control), CF (100 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) and the nociceptive response to an intraperitoneal injection of acetic acid was recorded 0.5 or 1 h later, respectively [18].



**Fig. 2** Effects of the chloroform fraction of *O. puberula* fruits extract (CF, 30–300 mg/kg, p.o.), aspirin (Asp, 400 mg/kg, p.o.), and morphine (Morph, 5 mg/kg, s.c.) in the first (panel A) and second (panel B) phases of formalin-induced nociception in mice. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6–8 animals, column C being indicative of control values. Significance levels are indicated by \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to the control group (ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

### Evaluation of a possible involvement of adenosinergic system

In order to evaluate the involvement of the adenosinergic system as a possible mechanism of action for the antinociceptive property of CF, mice were pretreated with the nonselective adenosine receptor antagonist caffeine (3 mg/kg, i.p.), as described previously [25]. After 20 minutes, mice received  $N^6$ -cyclohexyladenosine (CHA; a selective adenosine A1 receptor agonist, 0.03 mg/kg, i.p., used as a positive control), CF (100 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mL/kg, p.o.) and the nociceptive response to an intraperitoneal injection of acetic acid was recorded 0.5 or 1 h later, respectively.

### Measurement of locomotor activity

In order to exclude the possibility that the observed antinociceptive action could be related to nonspecific effects in the locomotor activity, the open-field test was carried out as previously described [26]. Mice were placed in a wooden box (40  $\times$  60  $\times$  50 cm) with the floor divided into 12 identical squares, and the number of squares crossed with all paws was counted during 6 minutes. Animals were treated with CF (100 mg/kg, p.o.) or DCTN (100 mg/kg, p.o.) 1 h prior to the test, while control animals received the same volume of vehicle.

### Reagents and drugs

The following substances were used: acetonitrile (Tedia Brasil), ethanol, acetone, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, silicagel 60, acetic acid and formalin (Merck), morphine sulphate (injectable solution, 10 mg/mL; União Química), naloxone hydrochloride (Cristália), aspirin (99% purity), and CHA (Sigma Aldrich). The drugs were dissolved in saline (0.9% NaCl). The organic fractions of *O. puberula* extract were dissolved in saline with 5% of Tween 80 (CRQ). Aspirin and DCTN were dissolved in saline with 1% DMSO (Merck) and 5% Tween 80 (CRQ). The final concentration of Tween 80 or DMSO did not exceed 5 and 1%, respectively, and did not cause any effect *per se*. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. and the data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post hoc test. *P* values less than 0.05 were considered significant. ID<sub>50</sub> values (dose capable of reducing nociceptive response by 50% relative to the control value) were determined by nonlinear regression analysis and reported as geometric mean with 95% confidence limits. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

### Supporting information

HPLC chromatograms for DCTN and CF, results of HF and EAF in the formalin test, and <sup>13</sup>C NMR of DCTN are available as Supporting Information.

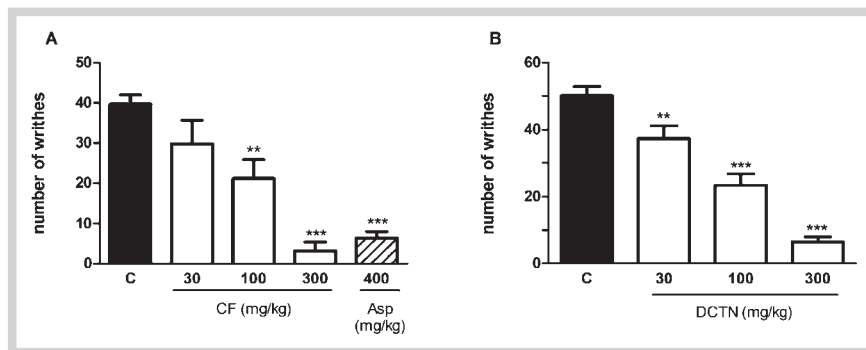
### Results

When submitted to HPLC, the CF fraction showed a major compound with RT = 17.06 min, which was isolated with 97% of purity (Fig. 1S, available as Supporting Information) and identified as DCTN (<sup>13</sup>C NMR available as Supporting Information, Fig. 2S). This alkaloid was used as the standard in a calibration curve, made by 6 points, with concentrations ranging from 5–100  $\mu$ g/mL. When comparing the peak areas, DCTN was shown to be present as 577 mg/g of CF, corresponding to 57% of CF (Table 1S, available as Supporting Information).

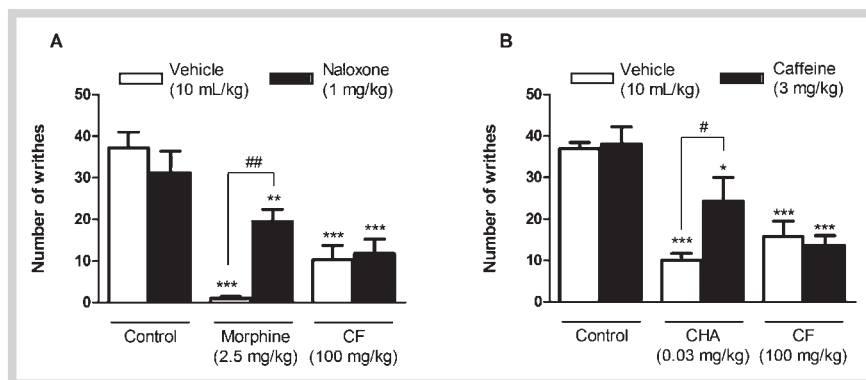
For initial screening of antinociceptive properties, mice were pretreated with different doses of HF, EAF, and CF obtained from *O. puberula* fruits, morphine or aspirin as positive controls, and then submitted to the formalin test. The administration of HF or EAF (30–300 mg/kg, p.o., 1 h prior) did not cause any antinociceptive effect against formalin-induced licking (Table 2S, available as Supporting Information). However, CF (30–300 mg/kg, p.o., 1 h prior) caused a significant inhibition of both neurogenic (0–5 min) and inflammatory (15–30 min) phases of formalin-induced licking. The calculated mean ID<sub>50</sub> values (and their respective 95% confidence limits) for these effects were: 190.0 (127.6–282.8) mg/kg and 120.3 (88.6–163.3) mg/kg and the inhibitions observed were 65  $\pm$  8 and 91  $\pm$  7% at a dose of 300 mg/kg, for first and second phases, respectively (Fig. 2A and B).

The reference opioid analgesic, morphine (5 mg/kg, s.c., 0.5 h prior), produced a significant inhibition of neurogenic (72  $\pm$  6%) and inflammatory (94  $\pm$  10%) phases of formalin-induced licking. In contrast, the nonsteroidal analgesic, aspirin (400 mg/kg, p.o., 1 h prior) was able to significantly reduce only the inflammatory (66  $\pm$  7%) phase of formalin-induced pain (Fig. 2A and B).

In order to confirm the antinociceptive property of CF, mice were pretreated with the same doses used in the formalin test (30–300 mg/kg, p.o., 1 h prior) and then submitted to the acetic acid model, a typical model of visceral inflammatory pain. The CF fraction produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice when compared to the control group, with a mean ID<sub>50</sub> value of 89.0 (52.5–150.9) mg/kg and inhibition of 92  $\pm$  6% at a dose of 300 mg/kg (Fig. 3A). The DCTN (30–300 mg/kg, p.o., 1 h prior), the main alkaloid present in CF, also produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions, with a mean ID<sub>50</sub> of 75.7 (55.0–104.1)



**Fig. 3** Effects of the chloroform fraction of *O. puberula* fruits extract (CF, 30–300 mg/kg, p. o., panel **A**) and aspirin (Asp, 400 mg/kg, p. o., panel **A**) or alkaloid dicentrine (DCTN, 30–300 mg/kg, p. o., panel **B**) on the acetic acid-induced nociception in mice. Each bar represents the mean  $\pm$  S. E. M. of 6 animals, column C being indicative of control values. Significance levels are indicated by \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  when compared to the control group (ANOVA followed by the Newman-Keuls test).



**Fig. 4** Effects of pretreatment with naloxone (1 mg/kg, i. p., panel **A**) or caffeine (3 mg/kg, i. p., panel **B**) on the antinociceptive effects of the chloroform fraction of *O. puberula* fruits extract (CF, 100 mg/kg, p. o.), morphine (2.5 mg/kg, s. c.), or CHA (0.03 mg/kg, i. p.) in the acetic acid-induced nociception in mice. Each bar represents the mean  $\pm$  S. E. M. of 6–8 animals. Significance levels are indicated by \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to the control group and #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  when compared to the agonists (morphine or CHA) (ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

mg/kg and an inhibition of  $87 \pm 3\%$  at a dose of 300 mg/kg (● **Fig. 3B**). The positive control aspirin also inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions in  $84 \pm 4\%$  at the dose of 400 mg/kg.

The results presented in ● **Fig. 4A** and **B** show that the antinociceptive effect of morphine (2.5 mg/kg, s. c., a nonselective opioid receptor agonist) or CHA (0.03 mg/kg, i. p., a selective adenosine A1 receptor agonist), but not that of CF, were significantly reversed by the previous treatment of mice with naloxone (1 mg/kg, i. p., a nonselective opioid receptor antagonist) or caffeine (3 mg/kg, a nonselective adenosine receptor antagonist), respectively, when analyzed against acetic acid-induced pain.

In order to discard a nonspecific action on motor performance, the active dose of CF (100 mg/kg) and the alkaloid DCTN (100 mg/kg) were orally given 1 h prior to the test, and neither CF nor DCTN affected the locomotor activity of mice in the open-field test compared with control animals (treated with vehicle alone). The means  $\pm$  S. E. M. of crossing numbers 1 h after administration were  $112.7 \pm 8.1$  for the control and  $105.4 \pm 8.5$  for the CF, and  $106.5 \pm 7.9$  for DCTN and  $113.0 \pm 3.8$  for the control.

## Discussion

The present results show the occurrence of the aporphinic alkaloid dicentrine as the major compound found in *O. puberula* fruits. This alkaloid is known to occur in a small amount in several different plant species, mainly from the Lauraceae family, including *O. puberula* leaves, bark, and roots [1, 7]; however, this appears to be the first report of a phytochemical evaluation of the atypical larger fruits of this species, showing dicentrine as the major alkaloid compound. The confirmation of alkaloid identity was made by comparison of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data with those

obtained in the literature [6], and HPLC quantification showed that dicentrine occurs as 57% of CF, being the majority alkaloid. The reasons why some subjects from this species develop these fruits were not investigated, but considering the fact that their phytochemical composition is based on a single type of a major substance, it may be suggested that this atypical development may be due to some specific injury suffered by the plant, leading to an overproduction of secondary metabolites, in this case, the alkaloid dicentrine [27].

Furthermore, no reports were found in the literature regarding an antinociceptive action of this plant and, although some biological actions of dicentrine have been reported, no specific antinociceptive effect of this alkaloid was found in any database. The present results show that the chloroform, but not hexane or ethyl acetate fractions obtained from the fractioning of *O. puberula* fruits extract, when given orally to mice, was able to reduce the nociceptive behavior in both phases of formalin-induced nociception, an effect that was confirmed in the acetic acid model. Surprisingly, when DCTN was administered, it also showed an antinociceptive effect that was similar in potency to CF (mean  $\text{ID}_{50}$  of 75.7 mg/kg and 89.2 mg/kg, respectively), suggesting that this alkaloid greatly contributes to the antinociceptive effect of *O. puberula* fruits extract.

When compared to a well-known nonsteroidal analgesic such as aspirin, administered by the oral route, the CF was shown to be more effective, since it reduced both phases of formalin-induced pain, while aspirin was effective only on the inflammatory phase. At the dose of 300 mg/kg, however, CF antinociceptive activity was similar to that produced by morphine. In the acetic acid model, on the other hand, both CF and DCTN displayed a potency that was similar to that produced by aspirin. Furthermore, the mean  $\text{ID}_{50}$  of DCTN in the acetic acid model (75.7 mg/kg) is comparable to the mean  $\text{ID}_{50}$  of aspirin (117.0 mg/kg) in the same

model [28]. Given the potency similarity with NSAIDs, it may be interesting to further investigate other similarities in the mechanism of action, such as the possible role of *O. puberula* as an anti-inflammatory agent. Indeed, several other species from the *Ocotea* genus have already been reported to have anti-inflammatory properties, mainly by inhibition of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) [19,29–31]. Antinociceptive activity of the *Ocotea* genus, on the other hand, has been reported to a lesser extent and its mechanism of action has not been well established. However, data from our group has shown that the antinociceptive effect of *O. suaveolens*, for instance, does not involve the activation of opioid, nitric oxide, or serotonergic systems [18], common endogenous pathways of pain control. With this in mind, we attempted here to verify if opioid and adenosinergic systems would be involved in the mechanism of action of CF from *O. puberula* fruits. Thus, our data show that the antinociceptive effect of CF was not reversed by the pretreatment of mice either with naloxone, an opioid receptor antagonist, or with caffeine, an adenosine receptor antagonist, suggesting that its action is unlikely to occur via opioidergic or adenosinergic systems. Finally, neither CF nor DCTN, at a dose that causes antinociception, produced any impairment of locomotor activity in the open-field test, which may be interpreted that the antinociceptive effect is not derived from a nonspecific effect on motor performance or sedation.

Of note, the doses used to assess the antinociceptive effects of DCTN differ from other reports in the literature, where the hypotensive effect on anesthetized rats was found with doses of 2 mg/kg by the intravenous route [12]. Moreover, DCTN (at doses of 5 to 10 mg/kg) was able to reduce plasma lipid levels and mean arterial pressure in hypertensive rats with a high-fat cholesterol diet [15]. These latter effects, however, besides being achieved by the oral route, were found with a continuous treatment of animals, twice a day during 4 weeks. For the antinociceptive effects, mice received a single oral administration of DCTN previous to the nociceptive stimulus. Those differences on the administration route and duration of treatment, besides the type of investigation, may account for the increased doses necessary for the antinociceptive effect of DCTN, in comparison with other reported effects.

In addition, it is well known that xenobiotics are metabolized in order to make their elimination from the body easier. In the case of DCTN, a few reports on pharmacokinetics have shown that its half-life of distribution and elimination is very short (4.3 and 45.2 minutes, respectively) after intravenous administration in rats [32], and at least 24 metabolites were found in miniature pigs urine 24 h after oral administration of DCTN [33]. These data could suggest that the antinociceptive effect of DCTN may be due to one or more of its metabolites. However, among the DCTN described metabolites [33], only actinodaphnine has a single report in the literature regarding an antinociceptive effect [34]. Thus, additional studies can be done to define whether this antinociceptive effect of DCTN is due to the alkaloid itself or its metabolites.

Taken together, these results show for the first time that *O. puberula* fruits have an important antinociceptive effect that seems to be derived from the presence of the alkaloid dicentrine, and although not established, the mechanism of this action is unlikely to occur via the adenosinergic or opioid system, or sedative effects. The mechanism by which CF and dicentrine produce antinociception still remains unclear, but we are still carrying out pharmacological studies for the characterization of the mecha-

nism(s) responsible for the antinociceptive action. These findings support, at least partially, the use of *O. puberula* in traditional medicine.

## Acknowledgements



This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-CNPq/FAPESC), Brazil. The authors kindly thank Pedro Zanin for all the help in the phytochemical studies, Cristina Mayumi Myiazaki for the NMR spectral data, and Professor Maria da Graça Nascimento for the optical rotation data.

## Conflict of Interest



None.

## Affiliations

- 1 Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil
- 2 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil
- 3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil
- 4 Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil
- 5 Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

## References

- 1 Araujo AJ. Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (Lauraceae) [dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2000
- 2 Farago PV. Estudo morfo-anatômico e fitoquímico de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, família Lauraceae, da região dos campos gerais, Ponta Grossa, Paraná [dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002
- 3 Jacobucci GA. Ocoteine, the alkaloid separated from the bark of *Ocotea puberula*. J Argentine Chem Soc 1954; 42: 18–29
- 4 Baralle F, Schvarzberg N, Vernengo M, Comim J. Dehydroocoteine and dihydroocoteine from *Ocotea puberula*. Experientia 1972; 28: 875–876
- 5 Baralle F, Schvarzberg N, Vernengo M, Moltrasio GY, Giacomello D. Thalimimine from *Ocotea puberula*. Phytochemistry 1973; 12: 948–949
- 6 Zanin SMW, Lordello ALL. Aporphine alkaloids in *Ocotea* species (Lauraceae). Quim Nova 2007; 30: 92–98
- 7 Zanin SMW, Miguel OG, Montrucchio DP, Costa CK, Lagos JB, Lordello ALL. Seedlings of *Ocotea puberula* (Lauraceae): identification and monitoring of aporphinoid alkaloids. Quim Nova 2011; 34: 743–747
- 8 Kondo Y, Imai Y, Hojo H, Endo T, Nozoe S. Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. J Pharmacobiodyn 1990; 13: 426–431
- 9 Huang RL, Chen CC, Huang YL. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. Planta Med 1998; 64: 212–215
- 10 Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5: 173–182
- 11 Konkimalla VB, Efferth T. Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aporphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. Biochem Pharmacol 2010; 79: 1092–1099
- 12 Yu SM, Hsu SY, Ko FN, Chen CC, Huang YL, Huang TF, Teng CM. Haemodynamic effects of dicentrine, a novel  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist: comparison with prazosin in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. Br J Pharmacol 1992; 106: 797–801

- 13 Chen KS, Wu YC, Wu TS. Bioactive alkaloids from *Illigera luzonensis*. J Nat Prod 1997; 60: 645–647
- 14 Teng CM, Yu SM, Ko FN, Chen CC, Huang YL, Huang TF. Dicentrine, a natural vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. Br J Pharmacol 1991; 104: 651–656
- 15 Yu SM, Kang YF, Chen CC, Teng CM. Effects of dicentrine on haemodynamic, plasma lipid, lipoprotein level and vascular reactivity in hyperlipidaemic rats. Br J Pharmacol 1993; 108: 1055–1061
- 16 Tsai TH, Wang GJ, Lin LC. Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassipoupa filiformis*. J Nat Prod 2008; 71: 289–291
- 17 Marquesini NR. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil – Guarani, Kaingang, Xogleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá [dissertation]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1995
- 18 Santos ARS, Beirith A, Calixto JB, Hess SC, Messana I, Ferrari F, Yunes RA. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. Planta Med 1999; 65: 50–55
- 19 Zschocke S, Drewes SE, Paulus K, Bauer R, Staden J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. J Ethnopharmacol 2000; 71: 219–230
- 20 Souza LA, Moscheta IS. Morphology and anatomy of the fruit development of *Ocotea puberula* (Rich.) Nees and *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). Acta Cient Venez 2000; 51: 84–89
- 21 Carvalho JLS, Cunico MM, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG. Term-stability of extractive processes from *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae for Soxhlet modified system. Quim Nova 2009; 32: 1031–1035
- 22 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983; 16: 109–110
- 23 Nascimento FP, Figueredo SM, Marcon R, Martins DF, Macedo-Junior SJ, Lima DAN, Almeida RC, Ostroski RM, Rodrigues ALS, Santos ARS. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor subtypes and protein kinase C pathways. J Pharmacol Exp Ther 2010; 334: 590–598
- 24 Campos ROP, Santos ARS, Vaz ZR, Pinheiro TR, Pizzolatti MG, Cechinel Filho V, Monache FD, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). Life Sci 1997; 61: 1619–1630
- 25 Luiz AP, Moura JD, Meotti FC, Guginski G, Guimarães CLS, Azevedo MS, Rodrigues ALS, Santos ARS. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. J Ethnopharmacol 2007; 114: 355–363
- 26 Rodrigues AL, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB, Santos ARS. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. Life Sci 2002; 70: 1347–1358
- 27 Hirano E, Possamai E. Fruit maturity state and seed germination of three species of Lauraceae. Scientia Agraria 2008; 9: 219–223
- 28 Vaz ZR, Cechinel Filho V, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. J Pharmacol Exp Ther 1996; 278: 304–312
- 29 Coy Barrera ED, Cuca Suárez LE. *In vitro* inhibitory activities of Lauraceae aporphine alkaloids. Nat Prod Commun 2010; 5: 383–386
- 30 Coy ED, Cuca LE, Sefkow M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 6922–6925
- 31 Ballabeni V, Tognolini M, Giorgio C, Bertoni S, Bruni R, Barocelli E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *in vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. Fitoterapia 2010; 81: 289–295
- 32 Tsai TH, Tsai TR, Chou CJ, Chen CF. Determination of dicentrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics. J Chromatogr B 1996; 681: 277–281
- 33 Lai YC, Kuo TF, Chen CK, Tsai HJ, Lee SS. Metabolism of dicentrine: identification of phase I and phase II metabolites in miniature pig urine. Drug Metab Dispos 2010; 38: 1714–1722
- 34 Conserva LM, Pereira CAB, Barbosa-Filho JM. Alkaloids of the Hernandiaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. Alkaloids Chem Biol 2005; 62: 175–243

## Supporting Information

### **Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula***

Deise Prehs Montrucchio<sup>1,2</sup>, Obdulio Gomes Miguel<sup>1</sup>, Sandra Maria Warumby Zanin<sup>1</sup>, Gabriel Araujo da Silva<sup>3</sup>, Alcíbia Helena Azevedo Maia<sup>4</sup>, Adair Roberto Soares Santos<sup>2,5</sup>.

#### **Affiliation**

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

#### **Correspondence**

Prof. Dr. Adair R. S. Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil.

E-mail: arssantos@ccb.ufsc.br; Phone: +55 48 3721 9352 (206); Fax +55 48 37219672



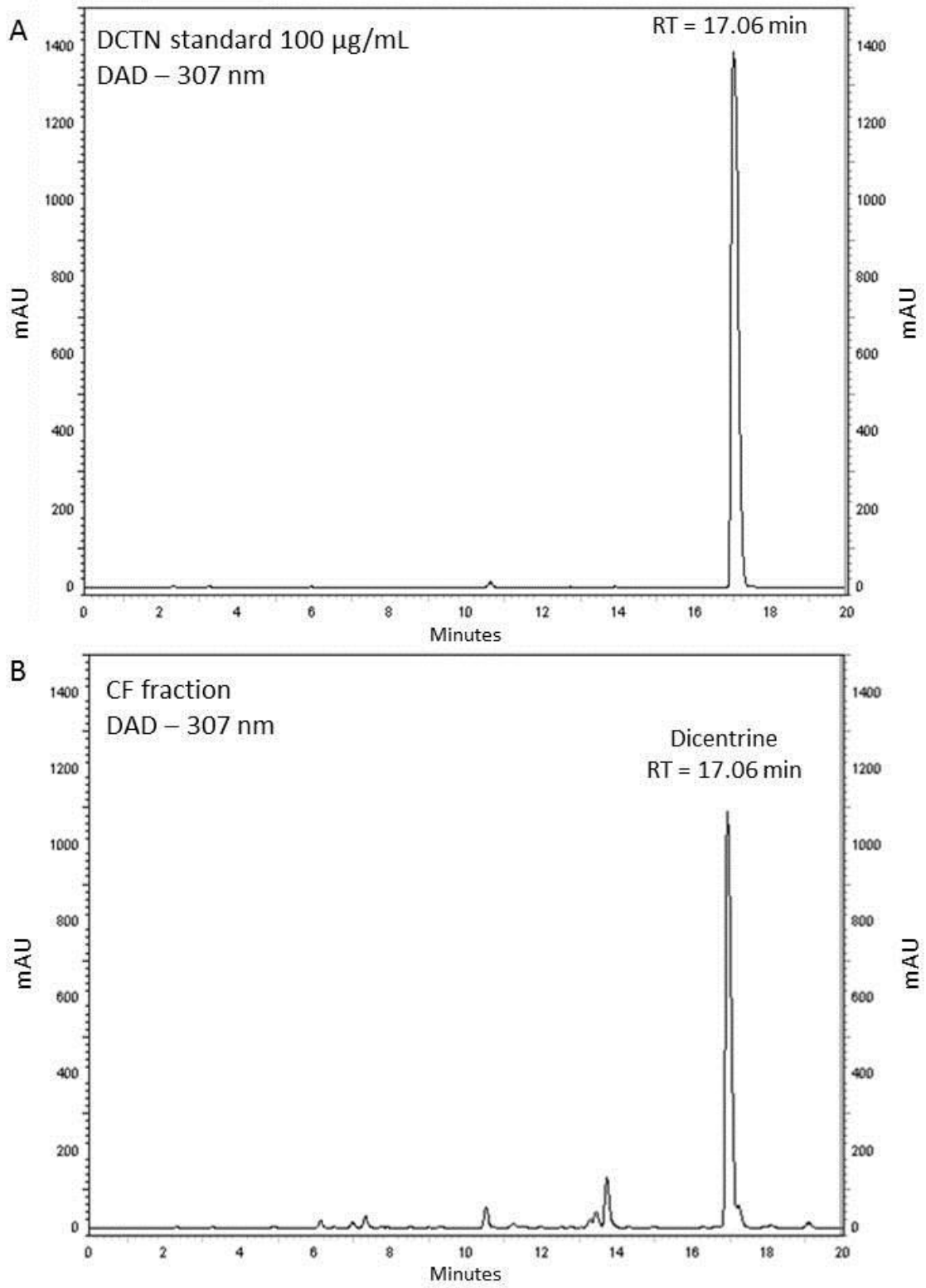


Fig. 1S - HPLC profile of dicentrine (DCTN) isolated from the CF fraction (panel A) and chloroform fraction (CF) of *O. puberula* fruits extract (panel B).

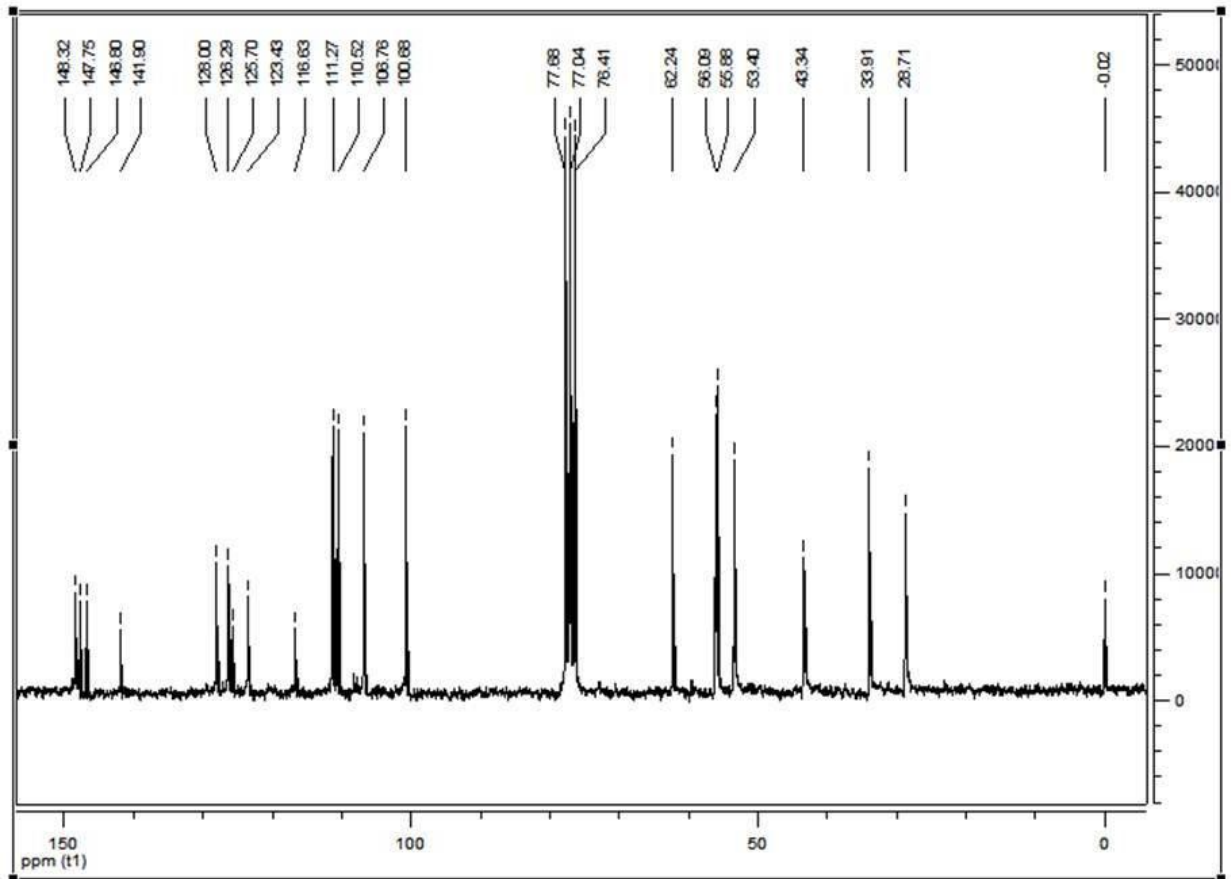


Fig. 2S –  $^{13}\text{C}$  NMR of dicentrine (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Table 1S – HPLC calibration curve of dicentrine and quantification in the CF fraction.

<i>Standard (DCTN) concentration *</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>RT** (min)</i>	<i>Area (mAU)</i>
97	17.06	17474606
48.50	16.98	10305938
24.25	17.06	5396649
12.13	17.06	2783002
9.70	17.05	2245480
4.85	17.06	1105552
<i>CF fraction concentration</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>RT** (min)</i>	<i>Area (mAU)</i>
100	17.06	10940201***
50	17.06	5902871***

\* Corrected to 97% of purity  
\*\* Retention time  
\*\*\* Equivalent to a mean of 577.94 mg of DCTN per gram of CF fraction

Table 2S - Effects of *n*-hexanic (HF) and ethyl acetate (EAF) fractions of *O. puberula* fruits extract in the formalin-induced nociception in mice.

<b>Treatment</b>	<b>Dose</b> ( <b>mg/kg</b> )	<b>Licking time (s)</b> ( <b>first phase</b> )	<b>Licking time (s)</b> ( <b>second phase</b> )
HF fraction	0	106.4 $\pm$ 4.1	305.1 $\pm$ 17.6
	30	98.8 $\pm$ 2.8	286.5 $\pm$ 25.0
	300	82.3 $\pm$ 12.1	260.6 $\pm$ 28.8
EAF fraction	0	93.0 $\pm$ 8.3	284.0 $\pm$ 12.4
	30	74.8 $\pm$ 12.3	290.8 $\pm$ 25.4
	300	73.6 $\pm$ 8.8	248.5 $\pm$ 37.7

Data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6 - 8). One-way ANOVA, no statistical difference between groups

## **ANEXO 2**

### **Antinociceptive Effect of Dicentrine: Evidence for a Role of TRPA1 Channels**

Manuscrito submetido - PAIN

## **Antinociceptive effect of dicentrine: evidence for a role of TRPA1 channels**

Deise Prehs Montrucchio<sup>a,b</sup>, Marina Machado Córdova<sup>c</sup>, Adair Roberto Soares dos Santos<sup>b,c,d\*</sup>

### **Affiliation**

<sup>a</sup> Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

### **\* Correspondence**

Prof. Dr. Adair R. S. Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil.

E-mail: arssantos@ccb.ufsc.br; Phone: +55 48 3721 9352 (206); Fax +55 48 37219672

**(23 pages and 6 figures)**

## **Abstract**

Dicentrine is an aporphinic alkaloid found in several plant species, mainly from Lauraceae family, that showed significant antinociceptive activity in an acute model of visceral pain in mice. In this work, we extended the knowledge on the antinociceptive properties of dicentrine and showed that this alkaloid also attenuates mechanical and cold hypersensitivity associated with cutaneous inflammation induced by Complete Freund's Adjuvant in mice. Given orally, dicentrine (100 mg/kg) reversed CFA-induced mechanical hypersensitivity, evaluated as the paw withdrawal threshold to von Frey hairs, and this effect lasted up to 2 hours. Dicentrine also reversed CFA-induced cold hypersensitivity, assessed as the responses to a drop of acetone in the injured paw, but did not reverse the heat hypersensitivity, evaluated as the latency time to paw withdrawal in the hot plate (50°C). Moreover, dicentrine (100 mg/kg, p.o.) was effective in inhibit nociceptive responses to intraplantar injections of cinnamaldehyde, a TRPA1 activator, but not the responses induced by capsaicin, a TRPV1 activator. When administered either by oral or intraplantar routes, dicentrine reduced the licking time (spontaneous nociception) and increased the latency time to paw withdrawal in the cold plate (cold hypersensitivity), both induced by the intraplantar injection of cinnamaldehyde. Taken together, our data adds information about antinociceptive properties of dicentrine in inflammatory conditions, reducing spontaneous nociception and attenuating mechanical and cold hypersensitivity, probably via a TRPA1-dependent mechanism. It also indicates that dicentrine might be potentially interesting in the development of new clinically relevant drugs for the management of persistent pain, especially under inflammatory conditions.

**Keywords:** Dicentrine, TRPA1, inflammatory pain, cold hypersensitivity, mechanical hypersensitivity.

## 1. Introduction

Pain is normally a transitory unpleasant sensation subsequent to a noxious or potentially injurious stimulus, acting as a warning system for tissue protection against injuries. It is a complex experience that involves not only the transduction of noxious environmental stimuli, but also cognitive and emotional processing by the brain [21,27]. Some circumstances, such as inflammatory or neuropathic conditions, may lead to alterations of the pain pathway, leading to hypersensitivity, and the pain becomes chronic and debilitating. Indeed, hypersensitivity to heat, cold and mechanical stimuli are well documented symptoms of inflammatory and neuropathic pain [3,27].

Several molecules and signaling pathways that contribute for noxious stimuli detection have already been characterized [21]. Among them, the transient receptor potential (TRP) ion channels appear to be molecular gateways in the sensory system [45]. In the field of pain, the subset of thermo-TRPs, mainly TRPV1 and TRPA1, seems to be important for initiation and maintenance of sensory nerve impulses that lead to nociception [31].

TRPA1 is a non-selective cation channel, expressed in primary sensory fibers that also express TRPV1. Around 97% of the TRPA1-expressing neurons also express TRPV1, while only 30% of fibers expressing TRPV1 also express TRPA1 [4,40].

TRPA1 channels play a role in transduction of chemical and physical stimuli into electric nerve signals [34], being activated by irritant chemicals such as allylisothiocyanate from mustard oil, allicin from garlic, cinnamaldehyde from cinnamon and formalin [2,5,20,29]. It is also a cold sensor, activated by temperatures below 17°C [40]. Inflammatory mediators such as bradykinin and prostaglandins can also indirectly activate TRPA1, thus, this channel is expected to be activated in inflammatory conditions [10]. Indeed, TRPA1 responses are increased in acute inflammatory process induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) and this channel seems to be important in the maintenance of mechanical hypersensitivity [10,13,35]. Thus, inflammatory sensitization of TRPA1 may underlie some components of inflammatory hypersensitivity, particularly to mechanical and cold stimuli [19].

Several studies demonstrate that TRPA1 is involved in cold pain transduction, more specifically in pathophysiological cold hypersensitivity, since the use of TRPA1 antisense oligodeoxynucleotide reverses the cold hypersensitivity after CFA-induced inflammation [11,32,40].

The actual knowledge about TRPA1 channels points to a potential clinical use of TRPA1 antagonists for the control of pain states, however, the number of known selective TRPA1 inhibitors is surprisingly low [10,19].

Dicentrine is an aporphinic alkaloid found in several plant species, mainly from Lauraceae family. Among its biological properties, it has been reported a vasodilator and antihypertensive action [42,43,49], platelet aggregation inhibition [7,48] and even a cytostatic effect against some tumor cell lines from mice and humans [17,23,24,39]. Recently, our research group reported that dicentrine has an important antinociceptive effect in a model of visceral pain in mice [30], which lead us to further investigate its effect on inflammatory models of pain, as well as possible mechanisms of action. In this context, here we investigate the antinociceptive effect of dicentrine in the CFA-induced inflammatory pain and show a possible involvement of TRPA1 in its mechanism of action.

## **2. Methods**

### **2.1. Animals**

Experiments were conducted using adult male Swiss mice (25-35g) obtained from the animal facility of Universidade Federal de Santa Catarina. Animals were housed at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  under a 12-h dark/12-h light cycle with free access to food and water, and acclimatized to the laboratory for at least one hour prior to testing. All experiments were previously approved by the Ethics Committee for Animal Research of Universidade Federal de Santa Catarina (Registration number PP00462, approved in December 9<sup>th</sup>, 2010 ) and were conducted in accordance to the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain on conscious animals [50]. The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatments.



## 2.2. Experimental design

### 2.2.1. Complete Freund's Adjuvant-induced chronic inflammatory pain

Mice received an intraplantar injection of 20  $\mu$ L of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (*Mycobacterium tuberculosis* heat killed and dried in paraffin oil), diluted at 50% or 80%, as described by Ferreira et al [15] with minor modifications. Control group received 20  $\mu$ L of vehicle (1% tween 80 in saline) intraplantar. CFA caused hind paw edema, mechanical and thermal hypersensitivity, evaluated 24 hours after CFA injection.

#### 2.2.1.1. Measurement of mechanical hypersensitivity

Mechanical hypersensitivity was evaluated as previously described [33] with minor modifications. Mice were acclimatized in individual clear boxes (9x7x11 cm) on an elevated wire-mesh platform, to allow access to the ventral surface of the hindpaws, and mechanical hypersensitivity was assessed by the sensitivity to the application of von Frey hairs (Stoelting Co., Chicago, USA). The von Frey filaments (0.02 – 4.0g) were presented perpendicularly to the plantar surface of the injected paw, and held in this position for 5s with enough force to cause a slight bend in the filament. Positive responses included an abrupt withdrawal of the hindpaw or flinching behaviour immediately following removal of the stimulus. A median paw withdrawal threshold was determined using an adaptation of the Dixon's up-down method [6].

#### 2.2.1.2. Measurement of thermal (heat/cold) hypersensitivity

Thermal hypersensitivity to heat was evaluated as previously described by Eddy and Leimbach [12] and adapted by Luszczki and Czuczwar [28]. Animals were placed in a hot plate set at  $50 \pm 1$  °C (Cold-hot Plate, AVS Projetos, Campinas, SP, Brazil) and the nociception was recorded as the latency time to withdrawal, shaking or licking the injected paw. A cut-off time of 20s was used to avoid tissue damage. Cold hypersensitivity was evaluated as described by Flatters and Bennett [16] with minor modifications. Mice were placed in a wire mesh floor and a drop of acetone (20

$\mu\text{L}$ ) was gently sprayed in the ventral surface of the right hindpaw. Behavioral response was analyzed during 30s and recorded in scores: 0 – no response; 1 – quick withdrawal, flick or stamp the paw; 2 – prolonged withdrawal or repeated paw flicking; 3 – repeated paw flicking with licking directed at the ventral side of the paw. Acetone application was repeated three times for each hindpaw, with intervals of five minutes, and the sum of the scores was used for data analysis.

### 2.2.2. Capsaicin - induced nociception

To evaluate the possible involvement of TRPV1 channels on dicentrine antinociceptive effect, mice were submitted to a test using capsaicin, a specific activator of these channels, as previously described by Santos et al [38]. Mice were pretreated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), dicentrine (100 mg/kg, p.o.) or AMG9810 (a selective TRPV1 antagonist used as positive control, 30 mg/kg, i.p.) 1h (for p.o. administrations) or 0.5h (for i.p. administration) prior to the injection of 20  $\mu\text{L}$  of capsaicin (TRPV1 activator, 1.6  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) in the plantar surface of the right hindpaw. Immediately after the capsaicin injection, animals were placed into clear observation chambers (9x11x13 cm) and the nociceptive response was evaluated as the time spent licking the injected paw during 5 min.

In another set of experiments, mice received vehicle (10  $\mu\text{L}/\text{paw}$ ) or dicentrine (100  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ) by intraplantar route, co-injected with capsaicin (1.6  $\mu\text{g}/\text{paw}$ ), in a total volume of 20  $\mu\text{L}$ . Immediately after the intraplantar injection, animals were placed into clear observation chambers (9x11x13 cm) and the nociceptive response was evaluated as the time spent licking the injected paw during 5 min.

### 2.2.3. Cinnamaldehyde - induced nociception

To evaluate the possible involvement of TRPA1 channels in dicentrine antinociceptive effect, mice were submitted to a test using cinnamaldehyde, a specific activator of these channels, as previously described by Cordova et al [8]. Mice were pretreated with vehicle (10 mL/kg, p.o.), dicentrine (100 mg/kg, p.o.) or camphor (a TRPA1 antagonist used as positive control, 7.6 mg/kg, s.c.) 1h (for p.o. administrations) or 0.5h (for s.c. administration) prior to the injection of 20  $\mu\text{L}$  of

cinnamaldehyde (TRPA1 activator, 1.3 µg/paw) in the plantar surface of the right hindpaw.

In another set of experiments, mice received vehicle (10 µL/paw) or dicentrine (100 µg/paw) by intraplantar route, co-injected with cinnamaldehyde (1.3 µg/paw), in a total volume of 20 µL. Immediately after the intraplantar injection, animals were placed into clear observation chambers (9x11x13 cm) and the nociceptive response was evaluated as the time spent licking the injected paw during 5 min.

Considering the results obtained with a single dose of dicentrine in this model, the next step was to evaluate the effects of increasing doses of dicentrine administered either by oral route (in order to evaluate a systemic effect) or intraplantar route (in order to evaluate a peripheral effect) in the licking time and in the hypersensitivity to cold. For this, mice were pretreated with increasing doses of dicentrine (10 – 100 mg/kg, p.o.) 1h before the injection of 20 µL of cinnamaldehyde (1.3 µg/paw), or received a co-injection of dicentrine (10 – 100 µg/paw) with cinnamaldehyde (1.3 µg/paw). Immediately after the intraplantar injections, animals were placed into clear observation chambers (9x11x13 cm) and the time spent licking the injected paw was recorded for 5 min. Then, 10 min after cinnamaldehyde injection, the same animals were placed in a cold plate (Cold-hot Plate, AVS Projetos, Campinas, SP, Brazil) set at  $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and the hypersensitivity was evaluated as the latency time to paw withdrawal. A cut-off time of 40s was used to avoid tissue damage.

### 2.3. Drugs

The following substances were used: CFA, cinnamaldehyde and camphor (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO), capsaicin and AMG9810 (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA). Dicentrine was isolated from *Ocotea puberula* fruits in the Phytochemistry Laboratory from Pharmacy Department, Universidade Federal do Paraná, as previously described [30], with purity greater than 98%. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. Dicentrine was dissolved in 1% DMSO (Merck, Germany) and 5% Tween 80 (CRQ, Brazil) plus saline (NaCl 0.9%), CFA, AMG9810 and cinnamaldehyde were dissolved in 1% Tween 80 plus saline, and all other drugs were dissolved in saline. The final

concentration of Tween 80 or DMSO did not exceed 5 and 1% respectively and did not cause any effect *per se*.

## 2.4. Statistical analysis

Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. and the data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post hoc test, except CFA-induced chronic inflammatory pain that was analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. ID<sub>50</sub> value (dose capable of reducing nociceptive response by 50% relative to the control value) was determined by nonlinear regression analysis and is reported as geometric mean with 95% confidence limits. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). *P* values less than 0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. CFA-induced mechanical hypersensitivity

Considering the significant antinociceptive effect of dicentrine in acute models, found previously by our group [30], here we investigated whether dicentrine would be effective in a chronic inflammatory model of nociception. For this, mechanical hypersensitivity was evaluated 24 h after an intraplantar injection of CFA. As demonstrated in Fig.1, CFA 50% caused mechanical hypersensitivity, which was characterized by the reduced paw withdrawal threshold when compared to the control group. Dicentrine (100 mg/kg, p.o.) was able to reverse mechanical hypersensitivity with a maximum effect 1h post-treatment, and this antinociceptive effect was maintained while dicentrine was administered daily (100 mg/kg, p.o., once a day), until the 11<sup>th</sup> day post-CFA injection. When treatment was interrupted for 2 days, mechanical hypersensitivity was re-established. On the 14<sup>th</sup> day the treatment was restarted, and dicentrine was able to reduce mechanical hypersensitivity with a time-course effect profile similar to the first day post-CFA injection, indicating no tolerance effect. However, this concentration of CFA (50%) did not induce thermal hypersensitivity to cold (data not shown), which lead us to a second experiment using

CFA at 80% of concentration. As shown in Fig.2A, the time-course effect of dicentrine was similar to that obtained with CFA 50%, with an anti-hypersensitivity effect that lasted up to 2 hours post-administration. Mechanical hypersensitivity was then evaluated at the 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days. Both groups (vehicle i.pl. and CFA i.pl.) were evaluated immediately before (basal) and 1h post dicentrine administration. Dicentrine (100 mg/kg, p.o.) was able to reverse mechanical hypersensitivity with inhibitions of  $68 \pm 13\%$  and  $65 \pm 10\%$ , respectively, with no effect *per se* (Fig.2B).

### 3.2. CFA-induced thermal hypersensitivity

Hypersensitivity to cold stimulus was evaluated at 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day post-CFA injection and as showed in Fig.3A, dicentrine (100 mg/kg, p.o.) was able to reduce the responses to acetone with inhibitions of  $79 \pm 6\%$ ,  $86 \pm 4\%$  and 100% on 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> days, respectively. Dicentrine had no effect *per se* (data not shown). However, when evaluated in the hot-plate, dicentrine did not increase the latency time for paw withdrawal, indicating no effect on heat hypersensitivity (Fig.3B)

### 3.3. Capsaicin and cinnamaldehyde-induced nociception

Since dicentrine reduced hypersensitivity to cold, but not to heat, we further investigated if the thermo-TRPs (TRPV1 and TRPA1 ion channels) would be involved in on its effect. As showed in Fig.4, the TRPV1 activator capsaicin induced a licking behavior characteristic of nociception, which was reduced by the TRPV1 antagonist AMG9810, either when administered by intraperitoneal or intraplantar routes, but not by dicentrine. However, as showed in Fig.5, dicentrine was able to reduce the licking time induced by cinnamaldehyde, a TRPA1 activator, either when administered by oral route (100 mg/kg) or intraplantar (100  $\mu$ g/paw), with inhibitions of  $75 \pm 1\%$  and  $53 \pm 8\%$ , respectively, similarly to the TRPA1 blocker camphor.

Given the indicative participation of TRPA1 on dicentrine effect, a dose-response curve was made evaluating both spontaneous nociception and cold hypersensitivity. As demonstrated on Fig.6, dicentrine was able to reduce the licking time and also increase the latency time on the cold plate, both in a dose-related manner. When given by oral route (panels A and B), dicentrine (10 – 100 mg/kg) produced an inhibition of spontaneous nociceptive response (licking) with a mean

ID<sub>50</sub> of 80.1 (41.5 – 154.7, 95% confidence limits) mg/kg. In the cold plate, dicentrine (100 mg/kg) increased the latency time for paw withdrawal in 80 ± 13%, similar to the positive control camphor (84 ± 17%). When administered by intraplantar route, co-injected with cinnamaldehyde, dicentrine (10 – 100 µg/paw) also produced an inhibition of licking time with a mean ID<sub>50</sub> of 74.5 (46.4 – 119.8, 95% confidence limits) µg/paw. In the cold plate, the dose of 100 µg/paw increased the latency time in 42 ± 5%, while the positive control camphor increased the latency time in 80 ± 4% (Fig.6, panels C and D).

#### 4. Discussion

The nociceptive response begins when primary sensory fibers are activated by some noxious stimulus, which may be chemical, thermal or mechanical. The TRP ion channels, especially TRPV1 and TRPA1, are highly involved in the transduction and sensitization in primary afferent somatosensory neurons. Besides activated by irritant chemicals, these ion channels are transducers of both thermal and mechanical stimuli, acting as molecular integrators for a range of diverse noxious stimuli [3,41]. Both TRPV1 and TRPA1 play an integral role in pain and neurogenic inflammation via sensory nerve activation, either at central or peripheral level [14]. Thus, the development of blockers of these ion channels may be of clinical interest for the control of chronic pain states.

Previous results from our research group have shown that a chloroform fraction obtained from an extract of *O. puberula* fruits, when given orally, was able to reduce mice nociceptive behavior induced by acetic acid, and we then demonstrated that this antinociceptive effect was partly related to the presence of dicentrine [30]. In the present work, we extended the knowledge on the antinociceptive effects of dicentrine using a chronic inflammatory model, and point to a possible interaction of this alkaloid with TRPA1 ion channels.

TRPA1 is expressed in sensory neurons of dorsal root ganglion (DRG), nodose ganglion (NG) and trigeminal ganglion neurons (TG) [40] and its role in peripheral detection of a variety of noxious stimuli is well established [22]. Peripheral application of TRPA1 agonists produces excitation of small diameter afferent fibers, leading to pain and hyperalgesia, which are reversed by peripheral application of TRPA1 antagonists [10,22]. However, less is known about the role of TRPA1

channels on spinal nociceptive transmission [22,25]. TRPA1 channels are expressed not only on distal, but also on central endings of primary afferent nociceptive fibers that are located within the spinal dorsal horn [25,34]. On central endings, activation of TRPA1 is thought to facilitate glutamate release, enhancing frequency and amplitude of glutamatergic transmission of the afferent signal to spinal dorsal horn neurons [25,34]. On the same line, Uta et al [44] demonstrated that the activation of spinal TRPA1 by cinnamaldehyde enhances the excitatory synaptic transmission.

TRPA1 channels can also be activated/modulated by endogenous agonists, such as oxidative stress products (hydrogen peroxide and 4-hydroxynonenal, for instance), nitric oxide, bradykinin, PAR-2 agonists and reactive prostaglandins such as 15d-PGJ2, produced following an initial inflammatory sign [1,14,34,36,47]. Some of these endogenous TRPA1 agonists are generated and appear in increased levels on painful conditions, like inflammatory processes. Thus, TRPA1 in nerve endings becomes over-activated by these inflammatory mediators and greatly contributes towards hypersensitivity associated with chronic pain states [1,34].

In this work we used a model of peripheral inflammation induced by CFA, which mimics a chronic inflammatory condition, and we showed that dicentrine was able to reduce mice nociceptive responses of mechanical and cold hypersensitivity, but not those of heat hypersensitivity. It is well established that under inflammatory conditions, TRPV1 and TRPA1 are some of the main transducers of nociceptive response [3]. Since inflammation is usually associated with tissue acidosis, TRPV1 channels may be directly activated by protons, leading to the nociceptive transmission, besides being involved in the hypersensitivity to heat, commonly associated with chronic inflammation [37]. TRPA1 channels, besides mediate cold hypersensitivity associated with inflammatory conditions [41], also have their role in the transduction of mechanical stimuli extensively reported, although the exact mechanism by which they are involved in pain transmission is still not clear [3,26,35,46]. In inflammatory models of nociception, such as formalin and CFA, TRPA1 channels seem to play a major role since pharmacological or genetic blockade of these channels substantially attenuate pain-related responses to formalin [29,41] and consistently prevent the initial development and the maintenance of mechanical hyperalgesia following CFA injection in mice [10,35].

Regarding thermo sensation, TRPV1 and TRPA1 channels are the main transducers of noxious heat and cold, respectively, responding to temperatures

above 43°C or below 17°C [9,40], and sensitization of these channels have been reported as crucial for thermal hyperalgesia in pathological conditions [18]. Indeed, some reports have shown that treatment with TRPA1 antisense oligodeoxynucleotides reduces behavioral hypersensitivity to cold after CFA-induced inflammation or sciatic nerve injury, and TRPA1 knockout mice exhibits impaired behavioral responses to a cold plate maintained at 0°C [32,36]. Furthermore, cold stimulus was found to potentiate the activation of TRPA1 caused by allyl isothiocyanate and 4-hydroxynonenal, which is consistent with the assumption of cold hypersensitivity being driven by TRPA1 under inflammatory conditions [1,11].

Taking this into account, it is reasonable to think that the antihypersensitivity effect of dicentrine in the CFA model may be mediated by TRPs. To test this hypothesis, we evaluated the antinociceptive effect of dicentrine against specific activators of TRPV1 and TRPA1. Capsaicin, a selective activator of TRPV1, induced a nociceptive behavior that was reversed by AMG9810, a selective blocker of TRPV1, but not by dicentrine. This finding is in line with the results on CFA model, when dicentrine did not reverse the heat hypersensitivity, suggesting that dicentrine do not interact with TRPV1 channels. On the other hand, when cinnamaldehyde (a selective activator of TRPA1) was used, dicentrine was able to reverse the licking time indicative of nociception and also increase the latency time of paw withdrawal in the cold plate, indicative of cold hypersensitivity. These findings are in line with the results on CFA model, when dicentrine reduced both mechanical and cold hypersensitivity, and strongly suggest that dicentrine acts through interaction with TRPA1 channels.

Considering the actual knowledge about the indicative participation of TRPA1 in modulation of painful conditions associated with inflammatory and neuropathic pain states, these channels constitute an interesting target for the development of new analgesic drugs [10,22]. The results presented here clearly point to an interaction with TRPA1 channels as a possible mechanism of action of dicentrine. However, as these results reflect only behavioral experiments, it would be interesting to carry out some specific molecular approaches, such as binding assay or immunohistochemical analyses for TRPA1 expression, techniques that could not be done here due to technical limitations of our laboratory. Despite these technical limitations, our results suggest that dicentrine may be an interesting molecule for further investigations on nociception.



## **5. Conclusion**

Dicentrine has an important antinociceptive effect in inflammatory conditions, reducing spontaneous nociception and attenuating mechanical and cold hypersensitivity associated with these conditions. This effect appears to be due to an interaction of dicentrine with TRPA1 channels, although the exact mechanism of this interaction is not clear. Taken together, our data adds information about antinociceptive properties of dicentrine and also indicates that it might be potentially interesting in the development of new clinically relevant drugs for the management of persistent pain, especially under inflammatory conditions.

## **Conflict of interest**

The authors state that there are no conflicts of interests in respect to the work reported in this paper.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) and Fundação de Apoio à Pesquisa Científica Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Brazil.

## **References**

- [1] Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther* 2012;133:189-204.
- [2] Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004;41:849-857.
- [3] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267-284.

- [4] Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 2006;124:1269-82.
- [5] Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12248-52.
- [6] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55-63.
- [7] Chen KS, Wu YC, Wu TS. Bioactive alkaloids from *Illigera luzonensis*. *J Nat Prod* 1997;60:645-7.
- [8] Córdova MM, Werner MFP, da Silva MD, Ruani AP, Pizzolatti MG, Santos ARS. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. *Neurosci Lett* 2011;495:173-7.
- [9] Cortright DN, Krause JE, Broom DC. TRP channels and pain. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:978-988.
- [10] da Costa DSM, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 2010;148:431-7.
- [11] del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 2010;30:15165-74.
- [12] Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;107:385-393.
- [13] Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 2008;4:48.
- [14] Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory neurons. *Br J Pharmacol* 2012;166:510-521.
- [15] Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and

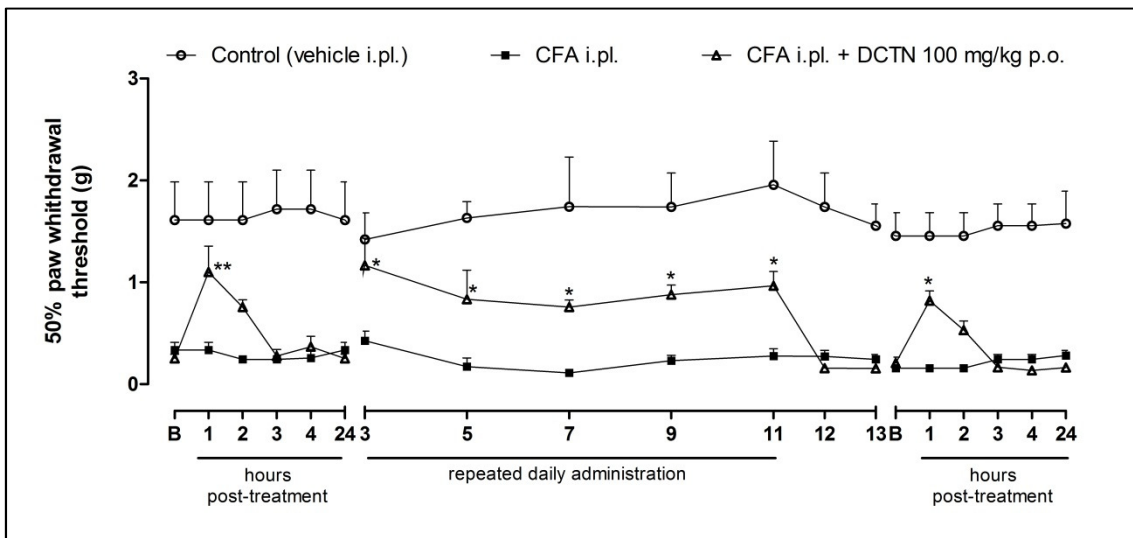
- nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 2001;41:1006-12.
- [16] Flatters SJL, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109:150-161.
- [17] Huang RL, Chen CC, Huang YL. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Med* 1998;64:212-5.
- [18] Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17:638-645.
- [19] Jiang LH, Gamper N, Beech DJ. Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets* 2011;12:724-736.
- [20] Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004;427:260-5.
- [21] Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-210.
- [22] Klafke JZ, da Silva MA, Trevisan G, Rossato MF, da Silva CR, Guerra GP, Villarinho JG, Rigo FK, Dalmolin GD, Gomez MV, Rubin MA, Ferreira J. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience* 2012;222:136-146.
- [23] Kondo Y, Imai Y, Hojo H, Endo T, Nozoe S. Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *J Pharmacobiodyn* 1990;13:426-431.
- [24] Konkimalla VB, Efferth T. Inhibition of epidermal growth factor receptor over-expressing cancer cells by the aporphine-type isoquinoline alkaloid, dicentrine. *Biochem Pharmacol* 2010;79:1092-1099.
- [25] Kosugi M, Nagatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 2007;27:4443-51.
- [26] Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006;50:277-289.
- [27] Levine JD, Alessandri-Haber N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:989-1003.

- [28]Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Isobolographic characterization of interactions between vigabatrin and tiagabine in two experimental models of epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:529-538.
- [29]McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13525-30.
- [30]Montrucchio DP, Miguel OG, Zanin SMW, Silva GA, Cardozo AM, Santos ARS. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. *Planta Med* 2012;78:1543-8.
- [31]Moran MM, McAlexander MA, Biró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:601-620.
- [32]Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 2005;115:2393-2401.
- [33]Palmer JA, Higuera ES, Chang L, Chaplan SR. Fatty acid amide hydrolase inhibition enhances the anti-allodynic actions of endocannabinoids in a model of acute pain adapted for the mouse. *Neuroscience* 2008;154:1554-61.
- [34]Pertovaara A, Koivisto A. TRPA1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. *Eur J Pharmacol* 2011;666:1-4.
- [35]Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Hunn T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 2007;3:40.
- [36]Premkumar LS, Abooj M. TRP channels and analgesia. *Life Sci*. 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.010>.
- [37]Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:45-51.
- [38]Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobediol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:4417-426.
- [39]Stévigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5:173-182.

- [40] Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819-29.
- [41] Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev* 2009;60:2-23.
- [42] Teng CM, Yu SM, Ko FN, Chen CC, Huang YL, Huang TF. Dicine, a natural vascular  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist, isolated from *Lindera megaphylla*. *Br J Pharmacol* 1991;104:651-6.
- [43] Tsai TH, Wang GJ, Lin LC. Vasorelaxing alkaloids and flavonoids from *Cassytha filiformis*. *J Nat Prod* 2008;71:289-291.
- [44] Uta D, Furue H, Pickering AE, Rashid MH, Mizuguchi-Takase H, Katafuchi T, Imoto K, Yoshimura M. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 2010;11:1960-73.
- [45] Wang H, Woolf CJ. Pain TRPs. *Neuron* 2005;46:9-12.
- [46] 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* 2008;131:1241-51.
- [47] Weng Y, Batista PA, Barabas ME, Harris EQ, Dinsmore TB, Kossyreva EA, Foshage AM, Wang MH, Schwab MJ, Wang VM, Stucky CL, Story GM. Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception. *Mol Pain* 2012;8:75.
- [48] Yu SM, Hsu SY, Ko FN, Chen CC, Huang YL, Huang TF, Teng CM. Haemodynamic effects of dicine, a novel  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist: comparison with prazosin in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br J Pharmacol* 1992;106:797-801.
- [49] Yu SM, Kang YF, Chen CC, Teng CM. Effects of dicine on haemodynamic, plasma lipid, lipoprotein level and vascular reactivity in hyperlipidaemic rats. *Br J Pharmacol* 1993;108:1055-61.
- [50] Zimmerman M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.

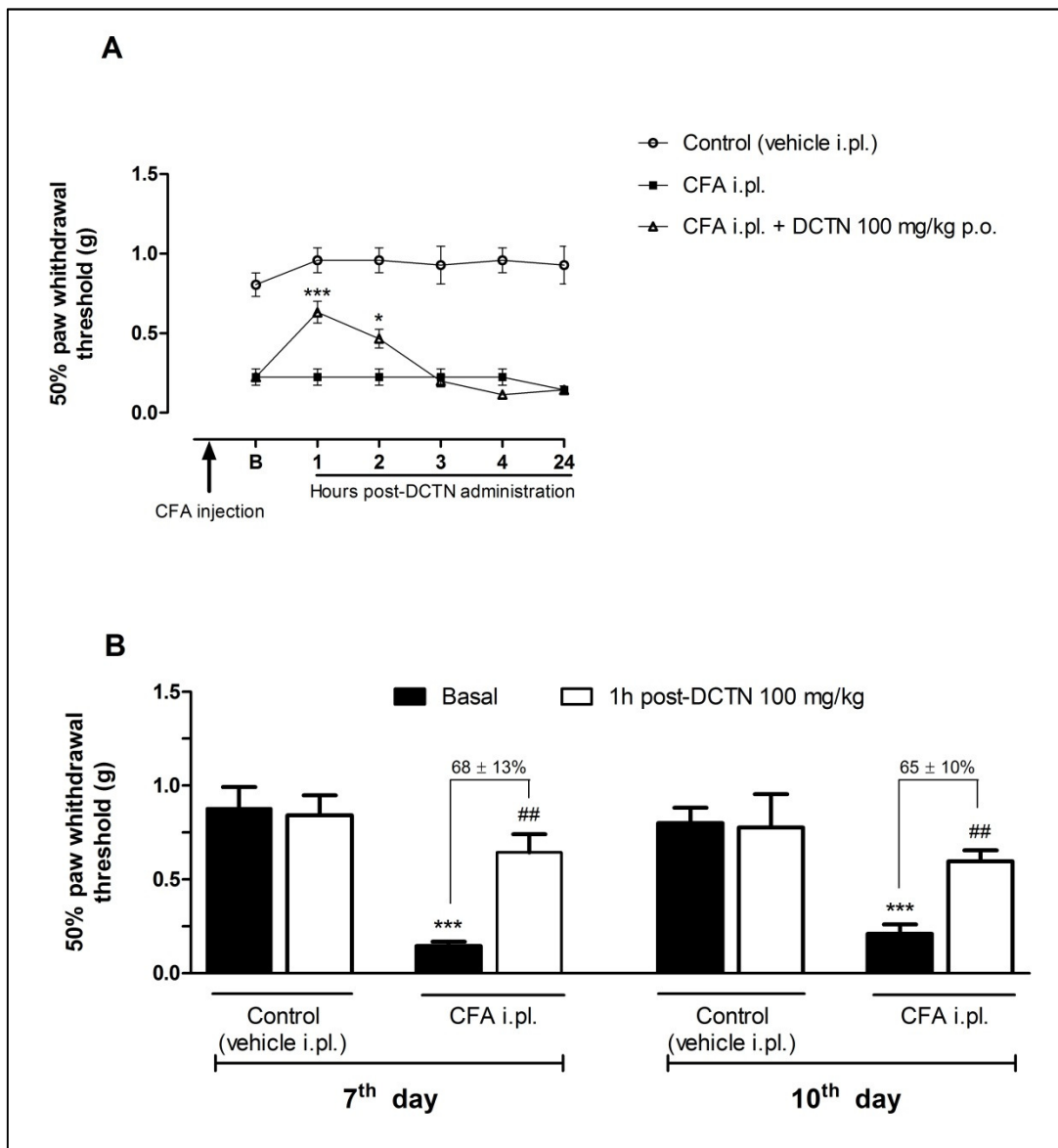
## FIGURES

### FIGURE 1



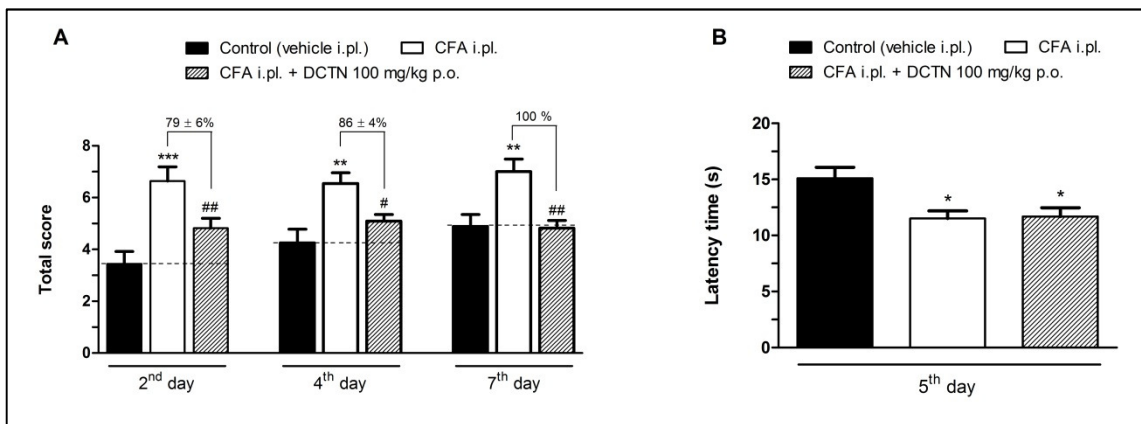
**Fig.1** – Effect of DCTN (100 mg/kg, p.o.) on mechanical hypersensitivity induced by CFA 50%. On 1<sup>st</sup> and 14<sup>th</sup> days, evaluations were done 1, 2, 3, 4 and 24 hours post-DCTN treatment; all other evaluations were done 1 hour post-treatment. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 animals and significance levels are indicated by \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 when compared to the CFA i.pl. group (two-way anova and Bonferroni post hoc test).

**FIGURE 2**



**Fig.2** – Effect of DCTN (100 mg/kg, p.o.) on mechanical hypersensitivity induced by CFA 80%. Panel A: time-course effect of DCTN evaluated at 1, 2, 3, 4 and 24 hours post-DCTN administration; each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 animals and significance levels are indicated by \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  when compared to the CFA i.pl. group (two-way anova and Bonferroni post hoc test). Panel B: effect of DCTN on 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days post-CFA injection, evaluated before DCTN administration (basal) and 1 hour post-DCTN administration; each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 animals and significance levels are indicated by \*\*\* $p < 0.001$  when compared to control group and ## $p < 0.01$  when compared to the respective basal of CFA i.pl. group (one-way anova and Newman-Keuls post hoc test).

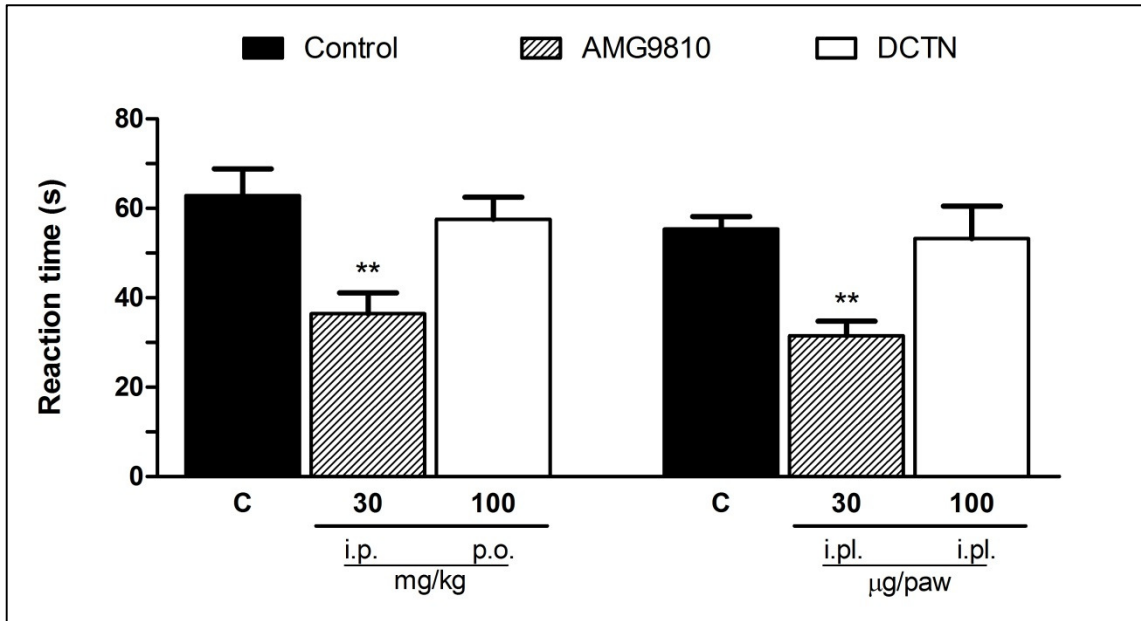
**FIGURE 3**



**Fig.3** – Effect of DCTN (100 mg/kg, p.o.) on thermal hypersensitivity to cold (panel A) and heat (panel B), induced by CFA 80%. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 animals. Significance levels are indicated by \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  when compared to control group and # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  when compared to the CFA i.pl. group (one-way anova and Newman-Keuls post hoc test).

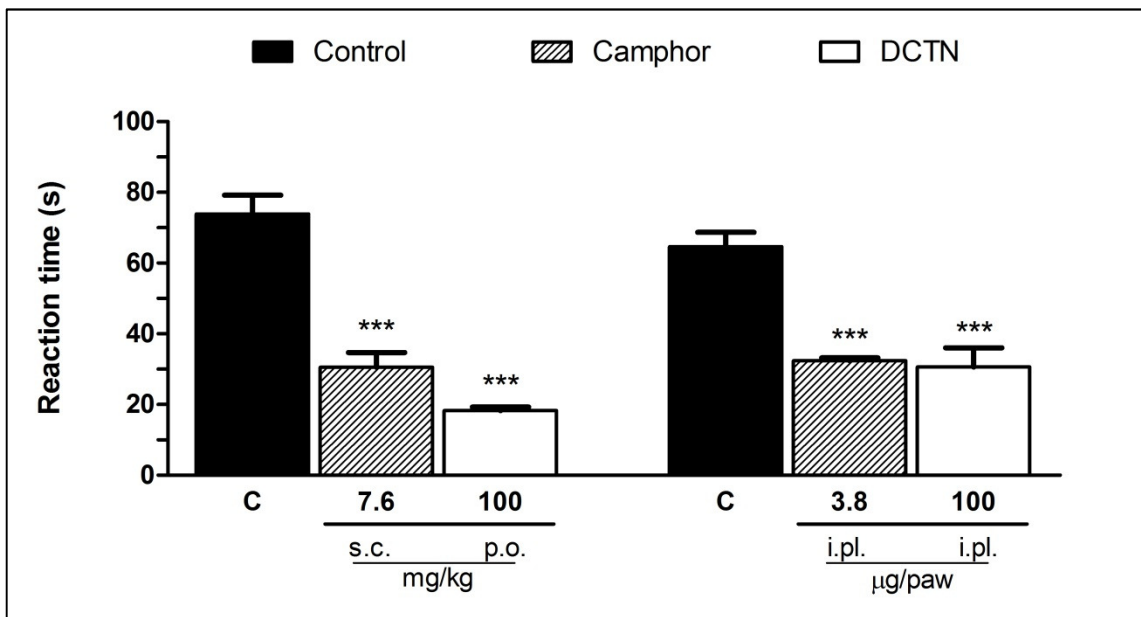


**FIGURE 4**



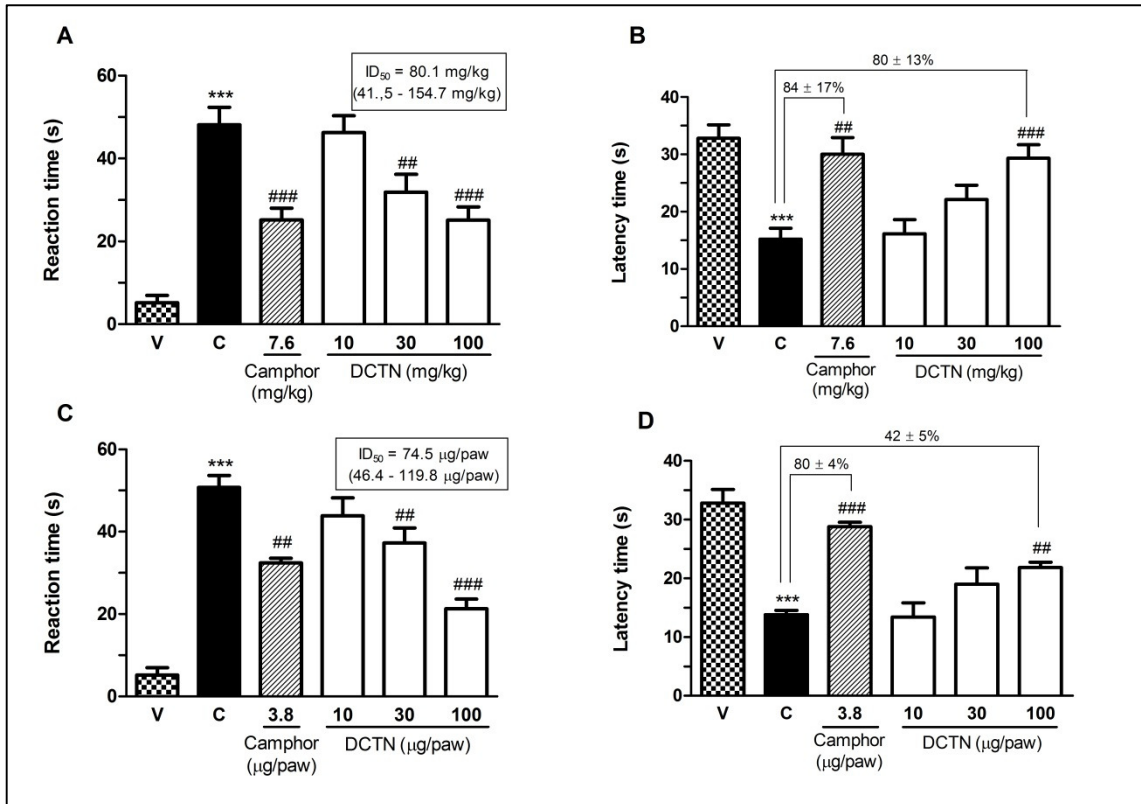
**Fig. 4** – Effect of DCTN administered by oral (100 mg/kg) or intraplantar (100 µg/paw) routes, or the TRPV1 antagonist AMG9810 by intraperitoneal (30 mg/kg) or intraplantar (30 µg/paw) routes on capsaicin-induced nociception. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 - 8 animals, being column C indicative of control values. Significance levels are indicated by \*\* $p < 0.01$  when compared to control group (one-way anova and Newman-Keuls post hoc test).

**FIGURE 5**



**Fig. 5** – Effect of DCTN administered by oral (100 mg/kg) or intraplantar (100 µg/paw) routes, or the TRPA1 antagonist camphor by subcutaneous (7.6 mg/kg) or intraplantar (3.8 µg/paw) routes on cinnamaldehyde-induced nociception. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 - 8 animals, being column C indicative of control values. Significance levels are indicated by \*\*\* $p < 0.001$  when compared to control group (one-way anova and Newman-Keuls post hoc test).

**FIGURE 6**



**Fig.6** – Effect of DCTN administered by oral route (10 - 100 mg/kg, panels A and B) or by intraplantar route (10 - 100 µg/paw, panels C and D), or the TRPA1 antagonist camphor by subcutaneous (7.6 mg/kg) or intraplantar (3.8 µg/paw) routes on cinnamaldehyde-induced nociception. Panels A and C represents the spontaneous nociception (licking time) and panels B and D represents the hypersensitivity to cold (latency time to paw withdrawal). Each bar represents the mean ± S.E.M. of 6 - 8 animals, being column C indicative of control values (cinnamaldehyde i.pl. injection) and column V indicative of group receiving only vehicle i.pl. injection. Significance levels are indicated by \*\*\* $p < 0.001$  when compared to vehicle (V) group and ## $p < 0.01$  and ### $p < 0.001$  when compared to respective control (C) groups (one-way anova and Newman-Keuls post hoc test).